

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



DOTTORATO IN SALVAGUARDIA E GESTIONE DELLE RISORSE NATURALI PER
UNO SVILUPPO SOSTENIBILE

XXII CICLO

Sviluppo di metodiche per la caratterizzazione ecotossicologica di
miscele di farmaci: protocolli sperimentali

COORDINATORE

Prof.ssa Giuliana Di Fiore

CANDIDATA

Dott.ssa Francesca Russo

TUTOR

Prof. Marco Guida

ANNO ACCADEMICO 2007-2008

1. INTRODUZIONE	5
2. SCOPO DEL LAVORO	7
2.1. SCOPO DELLA TESI	7
2.2. AMBITO DEL LAVORO	8
3. L'ECOTOSSICOLOGIA	9
3.1. STORIA DELL'ECOTOSSICOLOGIA	9
3.2. SAGGI ECOTOSSICOLOGICI	13
3.2.1. MISURA DEL DANNO	14
3.2.2 SAGGI ACUTI E CRONICI.....	16
3.3 BIOINDICATORI.....	20
4. NORMATIVA ECOTOSSICOLOGICA	23
4.1. FASI DELLE LEGISLAZIONE AMBIENTALE INTERNAZIONALE	23
4.2. FASI DELLA LEGISLAZIONE AMBIENTALE EUROPEA ED ITALIANA	24
4.3. QUADRO ECOTOSSICOLOGICO IN ITALIA.....	27
4.4. QUADRO ECOTOSSICOLOGICO IN EUROPA	31
4.4.1. DIRETTIVA 2000/60/CE.....	31
4.4.2. DIRETTIVA 2000/60/CE: ALLEGATO V	32
5. FARMACI	34
5.1. UTILIZZO DEI FARMACI IN ITALIA.....	34
5.2. INQUINAMENTO PRODOTTO DA FARMACI.....	35
5.2.1. RISCHI PER L'AMBIENTE E PER L'UOMO	35
5.2.2. REGOLAMENTAZIONE	35
5.2.3. POSSIBILI INTERVENTI.....	37
5.3. TEST ECOTOSSICOLOGICI SUI FARMACI	38
5.4. FARMACI TESTATI	40
5.4.1. DICLOFENAC – ANTIINFIAMMATORIO	41
5.4.2. IBUPROFEN- ANTIINFIAMMATORIO	42
5.4.3. ERYTHROMYCIN – ANTIBIOTICO.....	42
5.4.4.SULFAMETHOXAZOLE-ANTIBIOTICO BATTERIOSTATICO	44
5.4.5. AMOXICILLIN-ANTIBIOTICO BETA LATTAMICO	44
5.4.6. OFLOXACIN-FLUOROCHINOLONE	45
5.4.8. PROPRANOLOL-BETA BLOCCANTE	47
5.4.9. CARBAMAZEPINE-ANTICONVULSIONANTE.....	47

6. MATERIALI E METODI	48
6.1. TEST CONDOTTI E METODICHE UTILIZZATE	48
6.2. SCELTA DELLE CONCENTRAZIONI SAGGiate	49
6.3. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI.....	49
6.4. VALUTAZIONE DELLA TOSSICITA' ACUTA CON DAPHNIA MAGNA	51
6.4.1. MORFOLOGIA.....	52
6.4.2. STRUMENTAZIONE	53
6.4.3. TERMOREGOLAZIONE.....	54
6.4.4. ILLUMINAZIONE	54
6.4.5. OSSIGENAZIONE	54
6.4.6. ALIMENTAZIONE E MANTENIMENTO	54
6.4.7. COLTURA ALGALE	55
6.4.8. SOSPENSIONE DI LIEVITO.....	56
6.4.9. ACQUA PER L'ALLEVAMENTO	56
6.4.10. ESECUZIONE DEL SAGGIO	58
6.4.11. ESPRESSIONE DEI RISULTATI	58
6.5. VALUTAZIONE DELLA FITOTOSSICITA' CON LEPIDIUM SATIVUM	63
6.5.1. MORFOLOGIA.....	64
6.5.2. CONSERVAZIONE DI SEMI	65
6.5.3. LUCE E TEMPERATURA.....	66
6.5.4. ESECUZIONE DEL SAGGIO	66
6.5.5. ESPRESSIONE DEI RISULTATI	67
6.6. VALUTAZIONE DELLA TOSSICITA' CRONICA CON PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA.....	68
6.6.1. MORFOLOGIA.....	68
6.6.2. STRUMENTAZIONE	69
6.6.3. TERRENO PER LA COLTURA ALGALE	69
6.6.4. TERMOREGOLAZIONE.....	70
6.6.5. ILLUMINAZIONE	70
6.6.6. OSSIGENAZIONE E AGITAZIONE	71
6.6.7. PREPARAZIONE DELLA SOSPENSIONE ALGALE E MANTENIMENTO DEL CLONE ALGALE...	71
6.6.8. PROCEDURA DEL SAGGIO	71
6.6.9. CONTEGGIO CELLULARE MEDIANTE LA CAMERA DI BURKER.....	73
6.6.10. ESPRESSIONE DEI RISULTATI	73

7. RISULTATI E DISCUSSIONE	75
7.1. RISULTATI DEI SAGGI DI TOSSICITA' ACUTA CON DAPHNIA MAGNA.....	75
7.2. RISULTATI DEI TEST DI TOSSICITA' MEDIANTE I BIOINDICATORI DAPHNIA MAGNA, PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA E LEPIDIUM SATIVUM	84
7.3. RISULTATI DEI TEST DI TOSSICITA' ACUTA MEDIANTE L'UTILIZZO DI DAPHNIA MAGNA	93
7.5. RISULTATI DEI TEST DI TOSSICITA' CRONICA MEDIANTE L'UTILIZZO DI P.SUBCAPITATA.....	96
7.6 VALORI DI EC ₅₀	97
8. CONCLUSIONI.....	98
BIBLIOGRAFIA.....	100

1. INTRODUZIONE

I farmaci hanno un ruolo importante nelle terapie e nella prevenzione delle malattie sia umane che animali, ma essi possono anche rappresentare degli inquinanti ambientali in quanto spesso accade che il loro smaltimento improprio dopo utilizzo, gli scarichi di industrie produttrici degli stessi farmaci e lo smaltimento molte volte illegale contribuiscono a contaminare il suolo e le acque, in altre parole l'ambiente (Heberer T., 2002).

L'inquinamento da farmaci non può essere considerato un inquinamento "convenzionale", solo di origine industriale, o legato alle attività produttive: infatti, la fonte principale di inquinamento da farmaci è rappresentata dallo stesso ammalato che ne fa uso (Zuccato E., 2000). E' risaputo che i farmaci assunti, dopo aver svolto la loro azione nel nostro corpo, vengono escreti come tali attraverso le urine o le feci senza essere metabolizzati oppure come metaboliti attivi. In tal modo, veicolati attraverso le acque fognarie raggiungono i grandi depuratori urbani (se presenti), che sono progettati per abbattere sostanze chimiche molto più semplici rispetto ai farmaci (Castiglioni S., 2006). E' evidente la problematica che ne deriva: la loro diffusione nell'ambiente acquatico avviene senza ostacoli, proprio perché i principi attivi non vengono rimossi o distrutti dai depuratori e si riversano in fiumi e laghi, fino al mare, contribuendo ad un inquinamento diffuso (Halling-Sorensen B., 1998).

Dalla letteratura scientifica ne scaturisce che più del 70-80% dell'inquinamento da farmaci abbia origine dall'utilizzo umano, mentre tutte le altre fonti - inquinamento industriale, smaltimento improprio, smaltimento illegale, contribuiscano per il restante 20-30% (Halling-Sorensen B., 1998). Una volta disperso nell'ambiente, il farmaco, a seconda delle sue caratteristiche chimico-fisiche, viene degradato oppure può persistere a lungo, accumulandosi, anche se, per fortuna, le concentrazioni riscontrate nei serbatoi ambientali sono molto basse, si parla dell'ordine di milligrammi/metro cubo di acqua al massimo (Heberer T., 2002). Farmaci come eritromicina e sulfametoxazolo, ad esempio, hanno una vita media nell'ambiente superiore ad 1 anno (Halling-Sorensen B., 1998; Zuccato E., 2004). Inoltre, un altro aspetto da considerare, rispetto alla problematica dell'inquinamento da farmaci, è rappresentato dal fatto che tutte queste sostanze sono introdotte in modo continuo e costante nell'ambiente. Ciò conferisce anche alle sostanze maggiormente degradabili una sorta di persistenza continua, dovuta a un ciclo infinito di rimpiazzo, ed

espone gli organismi acquatici a un contatto cronico, che si prolunga per tutta la loro vita.

Il riconoscimento di questa nuova problematica ambientale ha dato il via ad una serie di studi per stabilire quanto il problema sia diffuso, quali siano le sue dimensioni e le possibili implicazioni per l'ambiente e la salute umana (Zuccato E., 2004).

I primi studi hanno seguito una logica casuale. Venivano raccolti campioni di acque e con varie metodiche si cercavano a caso molecole nell'ambito delle mille potenzialmente presenti. In seguito si sono diffuse ricerche più mirate su specifici farmaci, quelli ritenuti più rilevanti in base a calcoli probabilistici che combinavano dati sui volumi di vendita o di prescrizione, dati di metabolismo, e tempi di persistenza ambientale delle sostanze. Con questi metodi sono stati condotti vari studi, prima nel Nord Europa, poi in vari paesi del mondo, che confermano che l'inquinamento da farmaci è un inquinamento diffuso, di natura antropogenica, strettamente correlato alla presenza umana. I farmaci più comunemente presenti nell'ambiente sono in genere quelli maggiormente usati in quantitativi elevati, ma con molte eccezioni. Vi sono farmaci utilizzati in notevoli quantità che non si ritrovano nell'ambiente perché rapidamente degradati, come per esempio amoxicillina, e ve ne sono altri, usati in minori quantitativi, che si ritrovano in concentrazioni elevate perché sono estremamente persistenti come carbamazepine (Kummerer K., 2004).

Inoltre, occorre considerare che molte di queste sostanze hanno attività additiva o sinergica, e il loro effetto sui bersagli può venire quindi notevolmente potenziato. Uno studio condotto nella primavera 2006 all'Università dell'Insubria, a Varese, ha verificato, in vitro, effetti inibitori sulla crescita di linee cellulari embrionali umane di miscele di farmaci a concentrazioni nell'ordine del nanogrammo per litro, effetti significativamente superiori a quelli esercitati dai singoli farmaci (Pomati F., 2006). Inoltre può accadere che composti chimici, che individualmente non inducono alcun effetto, insieme possano esercitare un'azione tossica. Per questo motivo concentrarsi sui rischi ambientali del singolo composto può essere fuorviante (Berardino S., 2008).

2. SCOPO DEL LAVORO

2.1. SCOPO DELLA TESI

L'inquinamento prodotto da farmaci è un problema ambientale emergente. La letteratura scientifica indica che i farmaci possono essere considerati degli inquinanti ambientali ubiquitari, che contaminano l'ambiente attraverso una miriade di fonti diffuse (Zuccato E., 2008).

I prodotti farmaceutici, anche se possono essere degradati nell'ambiente tramite i processi biotici o abiotici, potrebbero fungere semplicemente da residui persistenti, a causa della loro infusione continua nei mezzi acquatici via effluenti degli stabilimenti di trattamento delle acque reflue. Bassi livelli dei prodotti farmaceutici sono stati rilevati in molti Paesi nelle acque superficiali, acque di mare, acque freatiche ed alcune acque potabili (Heberer T., 2002). Poiché i prodotti farmaceutici sono progettati con l'intento di curare e/o prevenire malattie sull'uomo, è importante ed interessante valutare gli effetti di queste sostanze specifiche sugli organismi del non-obiettivo nell'ambiente, anche a concentrazioni basse.

Il presente studio nasce in seguito al rilevamento, ad alte concentrazioni (dell'ordine dei mg/m³), di alcuni farmaci nelle acque dei principali impianti di depurazione di acque reflue dell'isola di Cipro, ed ha l'intento di valutare il potenziale impatto ecotossicologico degli stessi mediante l'utilizzo di alcuni bioindicatori, quali: *Pseudokirchneriella subcapitata* (alga verde unicellulare d'acqua dolce), *Daphnia magna* (microcrostaceo di acqua dolce), e *Lepidium sativum* (pianta erbacea).

Tale lavoro fa parte di un progetto internazionale di ricerca che prende il nome di "PHAREM-Development and application of innovative advance oxidation processes for the removal of active organic compounds in urban wastewaters and monitoring of toxicity".



Figura 2.1: isola di Cipro e principali impianti di depurazione.

2.2. AMBITO DEL LAVORO

Il progetto internazionale PHAREM è stato fondato dal gruppo di Ricerca dell'Università degli Studi di Cipro nel dicembre 2006. Collaborano a questo progetto, oltre all'Università dell'isola greca citata, l'Osservatorio Ecotossicologico Federiciano dell'Università Federico II - Napoli, l'Università di Salerno e l'Università dell'Egeo; i partners si sono posti l'obiettivo di caratterizzare ecotossicologicamente differenti gruppi di xenobiotici (metalli, pesticidi, alghe tossiche e farmaci) su varie matrici (sedimenti, acque superficiali, acque di mare, acque potabili, acque reflue, etc.) attraverso i bioindicatori *Artemia salina* (crostaceo d'acqua marina), *Sparus aurata* (pesce teleosteo della famiglia degli Sparidi), *Vibrio fischeri* (batterio bioluminescente), *Paracentrotus lividus* (riccio di mare della famiglia delle Echinidae), *Daphnia magna* (crostaceo d'acqua dolce), *Pseudokirchneriella subcapitata* (alga verde unicellulare) e *Lepidium sativum* (semi di pianta erbacea). Nel mio lavoro mi sono occupata, in particolare, della caratterizzazione ecotossicologica di nove farmaci, ovvero: amoxicillin, ofloxacin, erythromycin, sulfamethoxazole, diclofenac, ibuprofen, atenolol, propranolol e carbamazepine.

3. L'ECOTOSSICOLOGIA

3.1. STORIA DELL'ECOTOSSICOLOGIA

Dal 1969, anno in cui il termine ecotossicologia fu coniato da un comitato dell'International Council of Scientific Unions, molte sono state le definizioni attribuite a questa disciplina, che hanno posto di volta in volta l'accento sulla sua componente ecologica o tossicologica. Tra queste, la definizione data da Forbes and Forbes (1994) individua chiaramente le aree di interesse: "L'ecotossicologia rappresenta il campo di studio che integra gli effetti ecologici e tossicologici degli inquinanti chimici su popolazioni, comunità ed ecosistemi con il loro destino nell'ambiente (trasporto, trasformazione, e degradazione)".

In questa definizione viene sottolineata l'importanza del destino delle sostanze e dei loro effetti sugli ecosistemi, quali componenti chiave della funzione ecosistemica e viene incluso il concetto fondamentale che gli effetti tossicologici possono essere sia diretti (fisiologici, per esempio effetti su una specie preda) che indiretti (ecologici, per esempio effetti sulla competizione nella specie predatrice). Di fatto l'ecotossicologia è una disciplina che integra i campi di indagine della chimica (del destino delle sostanze nell'ambiente), della tossicologia ambientale (che si occupa della valutazione degli effetti a diversi livelli di integrazione biologica), e dell'ecologia (che fornisce indicazioni sui processi che regolano la struttura e funzione degli ecosistemi e le interazioni tra la componente biotica ed abiotica). Un'ulteriore importante componente che caratterizza l'ecotossicologia è quella previsionale, che si avvale di modelli matematici in grado di fornire predizioni sia sul destino ambientale delle sostanze, sia sui loro effetti sugli organismi esposti e sui sistemi ecologici.

Nel linguaggio comune è invalso l'uso di utilizzare il termine ecotossicologia per far riferimento allo studio degli effetti di inquinanti sulle popolazioni e comunità animali naturali (organismi acquatici, uccelli, invertebrati terrestri, ecc.), in contrapposizione alla tossicologia che è interessata agli effetti sull'uomo ed utilizza per l'estrapolazione modelli animali quali ratto, topo, coniglio. Tant'è che nelle procedure di valutazione del rischio (per esempio delle sostanze chimiche e prodotti fitosanitari) se ne fa menzione, rispettivamente, come studi ecotossicologici e studi tossicologici, salvo rimandare agli studi sui mammiferi di laboratorio per effettuare previsioni degli effetti sulle popolazioni di mammiferi selvatici. A questo riguardo è interessante notare che la definizione originale di questa scienza (data da

Truhaut nel 1977) includeva esplicitamente anche gli effetti sull'uomo, concetto ripreso recentemente da Newman, che estende il contesto ecosistemico alla biosfera. È importante sottolineare che, in ogni caso, la salute dell'uomo è strettamente dipendente da quella dell'ambiente, al punto che elevati livelli di degradazione dei sistemi naturali possono comprometterne addirittura l'esistenza per l'impossibilità di utilizzare le risorse. Oggetto dell'indagine ecotossicologica sono le sostanze introdotte nell'ambiente per opera dell'uomo quali i contaminanti, gli inquinanti e gli xenobioti (Marchini S., 2005).

La prima vera definizione di Ecotossicologia venne data in "Principles of Toxicology" nel 1978 "l'ecotossicologia riguarda gli effetti tossici degli agenti chimici e fisici sugli organismi viventi, in particolare su popolazioni e comunità all'interno di definiti ecosistemi; essa comprende anche lo studio delle modalità di diffusione di questi agenti e le loro interazioni con l'ambiente" (Blutler G., 1978). Le sue radici affondano, quindi, nella Tossicologia Classica: simili sono, infatti, l'approccio nella comprensione dei meccanismi d'azione a livello biochimico, fisiologico e biologico e la quantificazione delle risposte agli inquinanti.

L'ecotossicologia, dunque, fin dall'inizio si pone come una scienza che cerca di dare una risposta alle domande che ci si pone quando si tenta di prevedere il destino della qualità della vita a fronte dell'impatto dei composti tossici generati dall'attività antropica. In un'accezione più estesa, l'ecotossicologia può anche comprendere i fattori fisici (calore, radiazioni), chimici e biologici che sono potenzialmente fattori inquinanti, estendendo il suo campo di applicazione dal singolo organismo all'intero ecosistema. Questa disciplina si pone, nell'ambito delle Scienze e delle Scienze Ambientali, in particolare, in una posizione apicale non perché sia superiore alle altre scienze ma perché rappresenta il coacervo delle stesse. Senza la conoscenza di tutte le discipline scientifiche (almeno in una certa misura), non è possibile o è piuttosto difficile comprendere completamente l'ecotossicologia. Letteralmente, la Tossicologia è la "scienza dei veleni": l'ecotossicologia è dunque la scienza dei veleni per l'ambiente e l'ecotossicologia applicata descrive i metodi utilizzati per verificare se e quanto un determinato veleno può interferire con l'ambiente, e quali sono le soluzioni per evitare, alleviare o porre rimedio agli eventuali danni arrecati. I vocaboli "ecotossicologia" e "tossicologia ambientale" ormai vengono utilizzati come sinonimi, sebbene in prima battuta vi fosse fra le due discipline una distinzione. Inizialmente, infatti, il

primo termine identificava lo studio del destino e degli effetti dei contaminanti nell'ambiente, mentre il secondo si riferiva più specificatamente all'identificazione e alla quantificazione dei danni sugli organismi (a vari livelli di organizzazione) causati dall'inquinamento ambientale. L'ecotossicologia è una scienza che deve, come si suol dire, porre i numeri giusti al posto giusto ossia quantificare e scientificamente validare il rischio ambientale. Questi numeri, confrontati con quelli che la scienza medica indica come standard di qualità, permetteranno di prevedere, con elevata probabilità, il livello qualitativo di una popolazione nell'arco delle famose ottanta replicazioni cellulari che i genetisti ci propongono come tempo massimo della vita fisiologica. Proprio per questo l'impostazione moderna dell'ecotossicologia ha capovolto antichi criteri che la volevano come la scienza che esaminava solo gli effetti di composti chimici o situazioni di stress su una varietà di organismi. L'impostazione attuale dunque vuole l'ecotossicologia come scienza della previsione dei fenomeni ambientali, in grado, cioè, sulla base di un numero relativamente ristretto di informazioni e sulle caratteristiche chimiche e chimico-fisiche di un certo composto, di prevederne la diffusione nell'ambiente, la sua trasformazione per processi chimici e biologicamente mediati, ed il suo destino finale nei vari comparti e sub-comparti. Determinando le soglie ecologiche critiche, favorisce lo sviluppo di sistemi di monitoraggio ecologico, per verificare che le condizioni stabilite per il controllo di qualità siano state raggiunte. Inoltre, fornisce indicazioni utili per stabilire protocolli per la protezione e l'accumulo del capitale naturale e per stilare linee-guida atte all'implementazione del principio di precauzione, e per evitare gli sprechi e contribuire alla salute dell'ecosistema. Non da ultimo, aiuta la formulazione di adeguate risposte ai cambiamenti ambientali con pronte misure di rimedio ecologico (restoration), qualora l'evidenza indichi che sia stata superata un'importante soglia. In senso più restrittivo ed improprio, sebbene maggiormente pratico, l'ecotossicologia è stata descritta come l'esecuzione in laboratorio di test di tossicità su uno o più componenti di un ecosistema, allo scopo di proteggerlo interamente. Ad esempio, il D.lgs 156/2006 prevede l'effettuazione di test ecotossicologici sui reflui prima dell'immissione e sui corpi idrici cui i reflui afferiscono; il D.lgs 194/95 (e successive modifiche) prevede una classificazione dei prodotti fitosanitari basata anche sui risultati di test di tipo ecotossicologico; il DM 367/2003 stabilisce standard di qualità per l'ambiente

fondati su criteri ecotossicologici.

Il principio secondo il quale organismi acquatici potevano essere utilizzati per rilevare la presenza di agenti tossici ignoti è anteriore al 1900: infatti, già a metà '800 Penny (Penny C., 1863) e Weigelt (Weigelt C., 1885) descrivono gli effetti tossici di scarichi industriali su organismi selvatici, mediante l'esecuzione di studi di tossicità acuta della durata di qualche minuto od ora ed occasionalmente 2/4 giorni. Nel 1924 Carpenter pubblica il suo primo lavoro riguardante la tossicità di ioni di metalli pesanti, provenienti da miniere di piombo e zinco, su alcune popolazioni ittiche. La maggior parte degli studi condotti negli anni '30 e '40 ha lo scopo di fornire una maggiore comprensione nell'interpretazione dei test chimici, quale primo passo per la successiva incorporazione degli studi biologici nel processo di trattamento delle acque di scarico, o di approfondire le informazioni basilari su tolleranza, metabolismo, processi energetici delle varie specie sino a quel momento acquisite. Ad esempio, Ellis nel 1937 determina l'uso di *Daphnia magna* per misurare l'inquinamento dei corsi d'acqua, mentre nel 1944 Anderson ne amplia il lavoro e pone le basi per giungere a procedure standardizzate per test di tossicità con *Daphnia magna*. La prima procedura standardizzata viene, però, pubblicata nel 1951 da Doudoroff (Doudoroff P., 1951) e, in un secondo momento, incorporata in una procedura ASTM. Il concetto di criteri di qualità acquatica (WQA, Water Quality Criteria) fu formulato sommariamente dopo il secondo conflitto mondiale da McKee, nel 1952, e successivamente definito con maggiore precisione: "un criterio di qualità acquatica è definito come un dato scientifico utilizzato per giudicare quali limiti di variazione o alterazione dell'acqua non avranno effetti avversi sull'utilizzo della stessa da parte dell'uomo o degli organismi acquatici" (McKee J., 1963). Le conoscenze acquisite circa i test ecotossicologici portarono infine, negli Stati Uniti, alla stesura di manuali EPA (Environmental Protection Agency), nonché, nel 1976, di linee-guida per l'ambiente acquatico, riviste poi nel 1986 sempre per opera di EPA. Tra il 1970 e il 1980 la padronanza dei test ecotossicologici si sviluppò progressivamente e, se nel 1981 al primo convegno SETAC (Society of Environmental Toxicology and Chemistry) parteciparono 85 persone, nel 1991 i partecipanti furono 2230 (Hoffman D., 2003). Oggigiorno, a livello internazionale, esistono metodi standardizzati per numerose specie (pesci, invertebrati, alghe) d'acqua dolce e di mare, non solo per la colonna d'acqua, ma anche per i sedimenti.

Nel nostro Paese la situazione è un po' differente. In Italia l'istituzione dell'ANPA è avvenuta nel 1993 (23 anni dopo USEPA), oggi è evoluta in APAT e da qualche tempo ha istituito nel proprio organico un Settore che si occupa in maniera dedicata di Tossicologia ed Indicatori Ambientali, con tutte le difficoltà ed i ritardi maturati nell'arco di più di 30 anni.

3.2. SAGGI ECOTOSSICOLOGICI

L'ecotossicologia come scienza sperimentale si avvale dell'utilizzo di saggi al fine non semplicemente di testare la non pericolosità di un campione ambientale ma per cercare, attraverso il saggio appunto, di predire certi processi naturali. Anche se i test ecotossicologici permettono di definire una relazione causa-effetto, in genere i risultati ottenuti sono validi solo per le condizioni sperimentali utilizzate e non consentono di estendere le conclusioni ad altre specie o a sistemi naturali complessi, dal momento che non possono tenere conto delle complesse interazioni fra biota ed ambiente.

I saggi di tossicità con animali acquatici vengono effettuati per valutare se un dato composto, una miscela di composti o un campione d'acqua di scarico siano tossici e, in caso positivo, per definire il grado di tossicità o i valori di diluizione compatibili con la vita acquatica. Nel passato sono stati condotti saggi con organismi di una sola specie allo scopo di aumentare il grado di protettività del dato ottenuto; oggi si tende a sviluppare saggi "multispecie", condotti con organismi di livelli trofici diversi (batteri, alghe, crostacei, pesci) (APAT 2006).

Molteplici studi hanno ormai fornito evidenza sperimentale al fatto che il solo approccio chimico-analitico non fornisce gli strumenti sufficienti per definire il rischio ambientale associato ad una miscela di inquinanti. Il ricorso a saggi ecotossicologici consente di valutare da un lato la frazione biodisponibile degli inquinanti, dall'altro eventuali fenomeni di sinergia e/o antagonismo tra sostanze diverse. (Baudo R.,1985) quindi il metodo chimico non permette di definire i possibili effetti tossici di una miscela di sostanze, né tanto meno è in grado di stabilire se tra queste esistono effetti di tipo additivo, sinergico o antagonista, inoltre l'approccio classico, non può dare alcuna indicazione sul destino delle migliaia di molecole di sintesi rilasciate nell'ambiente, delle quali si ignorano sia la biodisponibilità che la pericolosità. Per restituire un quadro il più possibile completo ed affidabile della matrice indagata l'approccio ecotossicologico deve essere basato su una batteria di test che

impiegano organismi appartenenti a differenti livelli trofici e che comprenda sia test acuti, che cronici. (Dell'Orto N.,1997; Pasini M., 2000). La valutazione delle tossicità associate ad endpoint diversi incrementa, infatti, il valore predittivo di questi saggi. Quindi lo strumento d'elezione è rappresentato dall'uso di saggi ecotossicologici, che forniscono una valutazione globale degli effetti dannosi esercitati da miscele inquinanti sugli organismi viventi. Questo tipo di indagini non dovrebbe essere opzionale e neanche sostitutiva dei controlli chimico-fisici convenzionali; ma dovrebbe essere complementare, fino a portare al concetto innovativo di "analisi chimica guidata dal saggio biologico". L'importanza dei saggi ecotossicologici è stata evidenziata da tempo e trova applicazione in diversi settori: dall'analisi dei prodotti farmaceutici alle sostanze destinate alla cosmesi, dalle acque reflue ai percolati di discarica, dalle acque superficiali a quelle potabili, dai rifiuti tossico-nocivi alla bonifica di siti contaminati.

3.2.1. MISURA DEL DANNO

Un sistema biologico può entrare a contatto con un contaminante e, a seconda della maggiore o minore affinità, assorbirlo più o meno efficacemente: l'esposizione e la dose assunta sono generalmente direttamente proporzionali. La misura della risposta biologica (o danno) può avvenire solo dopo l'identificazione dell'effetto dovuto all'esposizione all'agente tossico. Spesso accade che ci si riferisca, erroneamente, all'effetto come alla quantificazione del danno (risposta) subito da un sistema biologico. Effetto e risposta in ecotossicologia possono essere definiti in questo modo:

- **EFFETTO:** indica il tipo di danno, ovvero la funzione biologica compromessa (es: la sopravvivenza, la motilità, la velocità di crescita)
- **RISPOSTA:** quantificazione dell'effetto espresso generalmente come % di incidenza in una certa popolazione.

La relazione tra la dose di una sostanza ed il manifestarsi di una risposta in un sistema biologico è schematizzato nel grafico 3.1

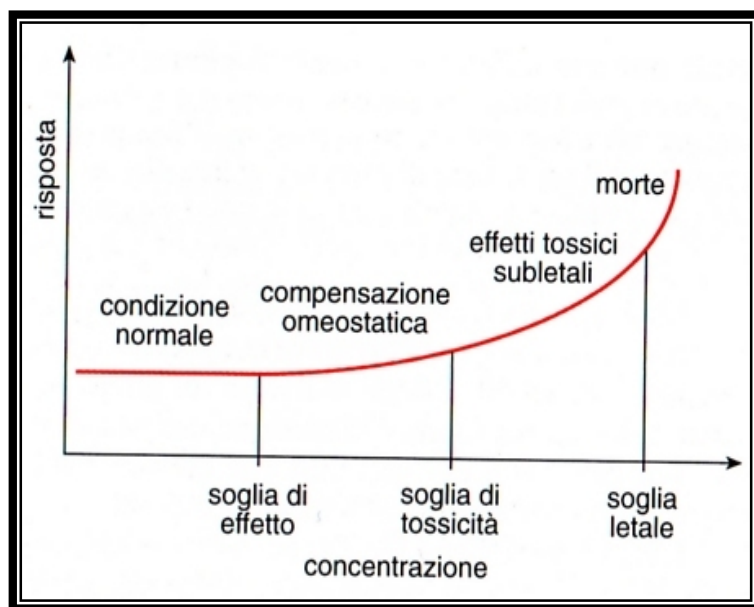


Grafico. 3.1: relazione tra la risposta individuale e il grado di esposizione ad un tossico (Gaggi G., 1998)

Di norma si può assumere che esista un livello di soglia al di sotto del quale una sostanza non produce alcun effetto negativo. Superata tale soglia si entra in una fase nella quale l'organismo mette in funzione i suoi meccanismi di difesa e di detossificazione. Finché questi meccanismi sono sufficienti a contrastare l'azione della sostanza, si potrà verificare un maggiore dispendio energetico ma non si manifesta nessun effetto negativo. Quando i meccanismi di difesa non sono più sufficienti a compensare l'azione tossica, si verifica l'effetto che darà origine inizialmente a manifestazioni croniche e, a dosi più elevate, a fenomeni di tipo acuto. I parametri più comunemente utilizzati per quantificare la risposta di saggi ecotossicologici sono i seguenti:

- LD_{50} (dose letale mediana): rappresenta la dose di una sostanza chimica che determina la morte del 50% degli individui in saggi di tossicità acuta per somministrazione diretta. Viene di norma espressa in termini ponderali per unità di peso corporeo dell'individuo. In modo analogo si esprimono dosi riferite a diverse percentuali di mortalità (LD_{10} LD_{90});
- LC_{50} (concentrazione letale mediana): rappresenta la concentrazione di una sostanza che determina la morte del 50% degli individui in saggi di tossicità acuta

per esposizione ambientale. Si deve riferire al tempo di esposizione;

- EC_{50} (concentrazione efficace mediana): rappresenta la concentrazione che produce nel 50% degli individui un effetto diverso dalla morte (immobilizzazione, arresto della crescita in saggi sia acuti che cronici). Deve essere riferita al tempo di esposizione;
- LT_{50} (tempo letale mediano): rappresenta il tempo necessario a determinare la morte del 50% degli individui esposti;
- NOEL: rappresenta il più alto livello al quale non si è manifestato alcun effetto;
- LOEL: rappresenta il più basso livello al quale è stato possibile evidenziare un effetto.

3.2.2 SAGGI ACUTI E CRONICI

I test di tossicità possono essere distinti in due categorie: acuti, e cronici.

- TOSSICITA' ACUTA: si intende l'insorgenza dell'effetto, dopo l'esposizione di un organismo, in un breve lasso di tempo. L'obiettivo dei test di tossicità acuta, è quello di misurare l'effetto dovuto all'esposizione di sostanze pure o di miscele, la cui durata sia compresa tra i 15 minuti e le 96 ore. Tipico esempio del più rapido è il saggio MicrotoxTM sulla soppressione dell'emissione di luce in batteri luminescenti, mentre saggi di letalità con pesci o crostacei, sono condotti fino a 24-96 ore. L'approccio maggiormente impiegato è la stima della EC_{50} o ED_{50} , con relativi parametri di dispersione (limiti fiduciali); questi valori vengono generalmente calcolati trasformando i dati sperimentali, originariamente espressi come % di risposta, in Probit e riportando le dosi o concentrazioni in passo logaritmico (Fig.3.2);
- TOSSICITA' CRONICA: l'obiettivo è il calcolo della soglia di tossicità, ovvero di quel livello di esposizione massimo che traccia il confine tra livelli efficaci e livelli non efficaci a tempo indeterminato ad esempio la durata della vita media degli organismi selezionati per il saggio. Il concetto di soglia è propriamente applicabile solo dopo avere assunto che si è di fronte a danni reversibili, come nel caso di alcune inibizioni enzimatiche, dove i meccanismi di riparazione del danno possono essere efficaci al di sotto di un determinato livello di esposizione (la soglia di tossicità, appunto). I tempi

di esposizione corrispondono, per molti organismi, ad uno o più cicli riproduttivi. L'effetto prescelto è spesso sub letale (velocità di crescita, alterazioni della capacità riproduttiva, modificazioni enzimatiche, alterazioni del comportamento) e alla fine si ottengono livelli di esposizioni efficaci e livelli non efficaci, dal valore massimo del quale si ricava il NOEL, che rappresenta una prima stima sperimentale del valore soglia per l'effetto considerato. Gli organismi utilizzati per questo tipo di test variano a seconda dello scopo e ovviamente la durata dei trattamenti è legata alla specie: per il crostaceo d'acqua dolce *Daphnia magna*, 21 giorni sono sufficienti per osservare gli effetti su più generazioni, mentre nel caso dei pesci i saggi devono essere di durata maggiore in modo da poterne osservare la crescita, lo sviluppo e la produzione almeno della prima generazione. L'elaborazione dei dati sperimentali differisce da quella impiegata in tossicologia acuta: in questo caso si tratta di discriminare quanto la risposta biologica osservata nei trattati risulti significativamente diversa da quella dei controlli. Si tratta in pratica di condurre un'analisi della varianza tra controlli e campioni, analisi che permette di individuare quali differenze di risposta ottenute nei diversi livelli di trattamento risultino statisticamente significative e quali no. La soglia di tossicità sarà collocata tra la massima concentrazione o dose non efficace (NOEL) e la massima statisticamente efficace (LOEL) (Fig.3.3).

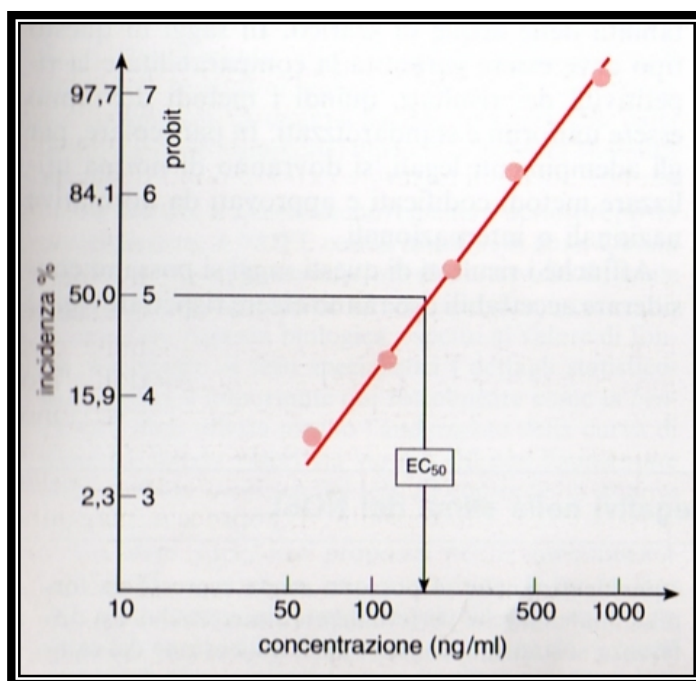


Grafico. 3.2: esempio di curva Log-Probit per la misura della tossicità acuta (Gaggi G., 1998)

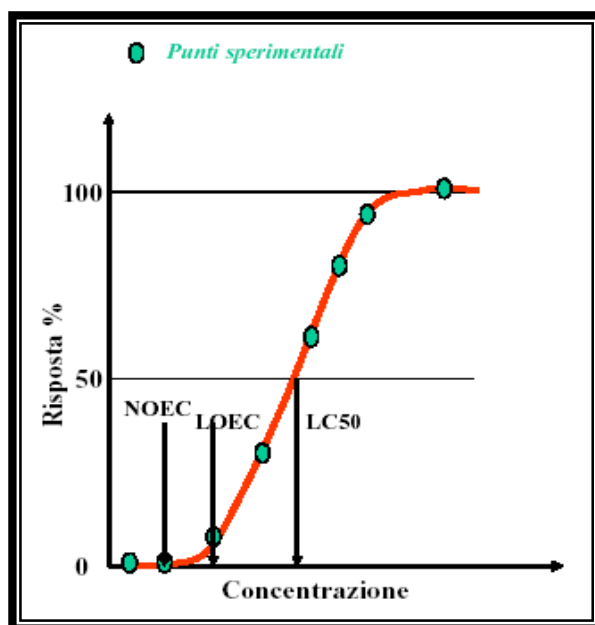


Grafico 3.3: Regione della soglia nelle curva di tossicità a tempo di esposizione costante (Gaggi G., 1998)

I saggi possono essere condotti in laboratorio, cioè in condizioni controllate dall'operatore, utilizzando una singola specie o più specie diverse, in esperimenti indipendenti. L'esposizione può essere statica (il mezzo contenente la sostanza viene preparato all'inizio

dell'esperimento e rimane tale sino al termine), semi-statica (il mezzo viene periodicamente rinnovato) o continua (il mezzo viene rinnovato di continuo). Particolarmente critica è la scelta della (o delle) specie, che può essere effettuata sulla base di differenti criteri, a seconda dello scopo:

- specie indigene dell'ambiente da proteggere, in funzione della rilevanza ecologica (specie chiave nella catena alimentare), dell'importanza economica o della facilità di reperimento e semplicità di gestione (disponibile e/o allevabile);
- specie particolari, in funzione della sensibilità ai composti tossici, delle disponibilità del laboratorio, della standardizzazione dei metodi.

I test ecotossicologici permettono di definire una relazione causa-effetto, anche se in genere i risultati ottenuti sono validi solo per le condizioni sperimentali utilizzate e non consentono di estendere le conclusioni ad altre specie o a sistemi naturali complessi, dal momento che non possono tenere conto delle complesse interazioni fra biota ed ambiente.

Un'approfondita rassegna bibliografica in materia mostra l'uso di molti organismi differenti ed evidenzia come, per le varie sostanze, ognuno possieda una diversa sensibilità. Se ne desume che, non essendo alcun organismo in grado di coprire l'intera varietà di risposte agli stressori e di rispondere a vari range di concentrazioni di xenobiotici, è necessario impiegare una batteria multispecie in cui gli ambiti di sensibilità non si sovrappongano, ma siano complementari. I componenti della batteria vengono solitamente scelti in base alla loro rappresentatività (un procariote, un vegetale, un animale superiore) ed in base alle loro relazioni con la catena trofica. L'uso di vertebrati implica parecchie complicazioni sperimentali, a causa delle difficoltà di reperimento e mantenimento e dei tempi più lunghi, in particolare nello studio della tossicità subletale e cronica: la vita di un vertebrato è, infatti, generalmente superiore di uno o più ordini di grandezza rispetto a quella di alghe ed invertebrati; quindi, si preferisce limitare il più possibile il loro impiego nei saggi. Sebbene maggiormente indicativo dei test su specie singole, l'uso di batterie di test ha in ogni caso la limitazione di non garantire il rilevamento degli effetti sugli organismi alla presenza di interazioni interspecifiche. Per cercare di sondare questi aspetti, si possono eseguire esperimenti più complessi, con esposizione contemporanea multispecie, ma anche così non

è possibile cogliere appieno gli effetti delle interazioni interspecifiche possibili: infatti, possono essere valutate solo quelle che si verificano tra le specie prescelte per l'esperimento, ma non quelle con altre specie non testate, che negli ambienti naturali comunque coesistono. Si potrebbe alternativamente realizzare l'esposizione sul campo, utilizzando apposite enclosure (in pratica delimitando fisicamente una parte dell'ecosistema, comprendente la comunità naturale del sito) ed eseguendo esperimenti in questi mesocosmi, dove le condizioni sono ancora in parte controllabili dallo sperimentatore. I test in situ rappresentano il caso più complesso, poiché sono effettivamente condotti nell'ambiente studiato, riducendo al minimo le manipolazioni, e le loro condizioni rispecchiano con precisione lo stato dell'ambiente. Questo tipo di studi si pone, quindi, ad un livello intermedio tra gli studi di laboratorio e l'esame estensivo dell'ambiente, realizzabile tramite il cosiddetto biomonitoraggio.

3.3 BIOINDICATORI

Gli organismi sono definiti "bioindicatori" quando, in presenza di concentrazioni inquinanti, subiscono variazioni rilevabili dal loro stato naturale. Un organismo può quindi essere considerato un buon bioindicatore qualora manifesti reazioni identificabili a differenti concentrazioni di dati inquinanti. I principali sintomi o endpoints presi in considerazione sono i seguenti:

- Variazione della struttura della comunità;
- Modificazioni morfologiche;
- Variazione della vitalità;
- Danni al patrimonio genetico.

Più organismi insieme possono essere utilizzati quali bioindicatori, in particolar modo quando i fenomeni inquinanti provocano variazioni misurabili a livello di ecosistema o di comunità. E' prassi ormai consolidata il valutare la tossicità di matrici complesse, quali quelle ambientali, mediante una batteria di bioindicatori, allo scopo di analizzare il più ampio spettro di effetti su organismi con risposte differenti ai vari composti presenti nelle matrici. Un buon bioindicatore dovrebbe possedere le seguenti caratteristiche:

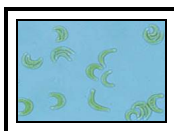
- Sensibilità agli inquinanti;
- Ampia distribuzione nell'area d'indagine;
- Scarsa mobilità
- Lungo ciclo vitale;
- Uniformità genetica.

La scelta del bioindicatore da utilizzare per i diversi saggi di tossicità dipende dall'obiettivo che si vuole conseguire e dalle caratteristiche peculiari che distinguono gli organismi gli uni dagli altri: ciascun bioindicatore presenta, infatti, una particolare caratteristica che può essere in parte vantaggiosa ai fini dell'esecuzione del test ecotossicologico e della sua attendibilità.

Di seguito sono elencati i bioindicatori utilizzati ed i rispettivi vantaggi e svantaggi.



Daphnia magna: crostaceo d'acqua dolce utilizzato per lo studio di matrici con salinità minima o assente. Presenta un buon livello di sensibilità ai tossici ed è facilmente allevabile in laboratorio. Si riproduce partenogeneticamente e ciò consente di ottenere popolazioni composte da individui con materiale genetico identico. È un organismo di piccole dimensioni con un ciclo vitale breve e ciò offre notevoli facilitazioni sul piano operativo.



Pseudokirchneriella subcapitata: alga unicellulare di acqua dolce presenta anch'essa un buon livello di sensibilità alle sostanze tossiche. È una specie rappresentativa dei sistemi acquatici sia oligotrofici che eutrofici ed è facilmente coltivabile in laboratorio. Ha inoltre un ciclo vitale molto breve.

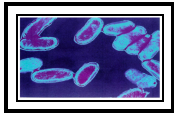


Lepidium sativum: i semi di questa pianta superiore offrono una notevole sensibilità agli inquinanti ed un'elevata riproducibilità nella risposta. Si trovano facilmente in

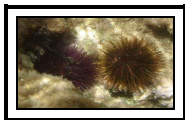
commercio presso un qualsiasi rivenditore di materiale per giardinaggio e sono molto economici. Il test è inoltre molto semplice da eseguire.



Artemia salina: crostaceo d'acqua marina viene impiegato per i test su campioni con elevata salinità. Presentano una buona risposta alla presenza di agenti inquinanti e si conservano facilmente sottoforma di liofilizzato anche per parecchi mesi.



Vibrio fischeri: batteri bioluminescenti utilizzati per qualsiasi tipo di matrice acquosa. Il test previsto per questi organismi offre il vantaggio di essere molto breve (15-30 minuti) e di ottenere quindi una risposta immediata al tossico in esame. In commercio sono disponibili dei kit per rendere ancora più semplice l'utilizzo di tale metodica.



Paracentrotus lividus: I motivi principali che inducono l'utilizzo del riccio di mare nei saggi ecotossicologici sono la facile reperibilità degli animali in tutto il mondo, i processi di fecondazione e di sviluppo sono molto sensibili alle condizioni ambientali, la possibilità di osservare direttamente la fecondazione e di ottenere allo stato attuale dell'opera gameti tutto l'anno ricorrendo però all'uso di due specie che alternano il loro periodo riproduttivo, costi contenuti per la realizzazione del test, le risposte hanno un'alta significatività statistica, perché si usano milioni di uova e di sperma.



Pesci: Questi saggi in genere sono i meno diffusi e più problematici da attuare, per una serie di motivi tecnico-pratici. Infatti, non è sempre agevole per i soggetti scelti sopportare bene le condizioni di acquario nelle quali vengono allevati; inoltre, è essenziale che i pesci siano tutti sani e di dimensioni omogenee. A tutto ciò si aggiungano anche i problemi di spazio, alimentazione e mantenimento che vanno previsti. Le metodiche di tipo acuto prevedono l'impiego di test generalmente a 96 ore, mentre i test di tipo cronico variano a seconda della specie utilizzata.

4. NORMATIVA ECOTOSSICOLOGICA

4.1. FASI DELLE LEGISLAZIONE AMBIENTALE INTERNAZIONALE

La nozione di “ambiente” è entrata con prepotenza nel linguaggio corrente dagli anni '30 del secolo scorso. Essa si presta a riassumere i diversi aspetti del rapporto tra l'uomo e il mondo che lo circonda, le molteplici articolazioni geografico-territoriali in cui si sviluppa tale rapporto e il suo continuo svolgersi ed evolversi (Cecchetti M., 2000). In quell'epoca, si fece largo l'idea che alcuni comportamenti umani fossero dannosi per l'ambiente e la conservazione delle risorse e delle aree naturali divennero un'esigenza primaria sia sul piano sociale sia giuridico. Si generò la consapevolezza che i problemi inerenti ad esso, in particolar modo la tutela dei luoghi nei quali l'uomo vive ed esplica le sue attività, dovevano trovare una risoluzione e una loro disciplina. Si giunse così all'affermazione dell'ambiente come valore, cui il Diritto doveva dare espresso ed in equivoco riconoscimento. La convinzione di una certa responsabilità dell'uomo nei confronti dell'ambiente circostante aprì la strada all'idea che disposizioni normative, nazionali ed internazionali, potessero essere una soluzione per l'inquadramento della tutela ambientale. Dal secondo dopoguerra la tutela dell'ambiente entrò nei programmi delle organizzazioni internazionali di nuova formazione. La Carta dell'ONU non ne faceva esplicito richiamo, ma era chiara l'intenzione di inserire i problemi ambientali tra quelli economici, sociali, culturali ed umanitari affrontati nel documento. Indicazioni più specifiche si trovano nello statuto della FAO dove è prevista “la conservazione delle risorse naturali e l'attuazione dei metodi perfezionati di produzione agricola”. Queste iniziative, però, raggiunsero risultati modesti.

Una nuova impostazione delle problematiche ambientali nacque nel corso della Conferenza di Stoccolma (1972), il cui documento conclusivo s'intitolò Dichiarazione sull'ambiente umano: Le relazioni internazionali per proteggere e rendere migliore l'ambiente, dovrebbero essere affrontate con spirito di cooperazione da tutti i paesi grandi e piccoli, su un piano d'uguaglianza. La cooperazione raggiunta attraverso accordi multilaterali o bilaterali o con altri mezzi appropriati, è indispensabile per limitare efficacemente, prevenire, ridurre ed eliminare le aggressioni all'ambiente risultanti da attività esercitate in qualsiasi ambito; ciò nel rispetto della sovranità e degli interessi di tutti gli Stati.

I principi affermati spaziarono molto più di quanto la sua denominazione non lasci

immaginare. Si fece espresso riferimento ad aspetti riconosciuti come fondamentali nella vita dell'uomo: la libertà, l'uguaglianza e il diritto di vivere in un ambiente che garantisca dignità e benessere. Di grande rilievo fu il richiamo alla cooperazione degli Stati Membri in iniziative a favore delle vittime d'inquinamenti o di altri danni ecologici e fu riconosciuto all'uomo il compito di salvaguardare l'ambiente per lo sviluppo della vita della propria generazione e di quelle future.

Dopo la Conferenza di Stoccolma, il tema fu ripreso dalla Conferenza delle Nazioni Unite (1989). Si riconobbe la grande complessità dell'argomento e le grandi difficoltà implicite in un lavoro che avrebbe dovuto coinvolgere il mondo intero. L'Assemblea Generale dell'ONU in data 22 dicembre 1989 deliberò, con la risoluzione 44/228, la convocazione di un'altra Conferenza Mondiale su Ambiente e Sviluppo da tenersi a Rio de Janeiro.

La Conferenza Mondiale su Ambiente e sviluppo di Rio (giugno 1992) ha avuto importanti risultati tra cui l'istituzione di una commissione sullo sviluppo sostenibile – Commission on Sustainable Development – e la firma dei seguenti accordi:

- la Dichiarazione di Rio sull'ambiente e lo sviluppo;
- la Convenzione Quadro delle Nazioni Unite;
- la Dichiarazione di principi per la conservazione e lo sviluppo sostenibile delle foreste;
- l'Agenda 21.

Il piano, sottoscritto da circa 150 paesi, dovrà essere attuato a partire dal XX secolo e per l'intero XXI; la responsabilità della sua attuazione ricade su molti soggetti e implica il coinvolgimento del livello globale, nazionale e locale in ogni area in cui l'attività umana ha un impatto rilevante sull'ambiente.

La Convenzione Quadro ha fissato degli obiettivi che sono stati oggetto di ulteriore sviluppo nel Protocollo di Kyoto¹ del 1997.

Il vertice di Johannesburg, infine, tenutosi tra il 26 agosto ed il 4 settembre 2002, ha ribadito e confermato le iniziative e gli impegni sottoscritti per uno sviluppo sostenibile. Negli anni successivi si è proceduto seguendo queste linee guida.

4.2. FASI DELLA LEGISLAZIONE AMBIENTALE EUROPEA ED ITALIANA

Quando ebbe inizio il processo di formazione europea, la sensibilità in materia ambientale era molto scarsa sia tra le forze politiche sia nell'opinione pubblica.

Le prime disposizioni in materia ambientale furono introdotte nella forma di regolamenti e direttive che sorressero l'attuazione di programmi di intervento comunitario. Il primo programma si fondava sui Trattati di Roma e riguardava lo studio di varie problematiche. Il secondo programma di azione, portò l'impegno comunitario in materia di inquinamento e di perturbazioni ambientali, compresi interventi sulle acque, sull'atmosfera e per la prima volta anche sull'inquinamento acustico. Nel terzo programma fu introdotta una valutazione sulle condizioni di vita ed un uso equo delle risorse naturali. Questi primi tre programmi costituiranno le basi per quella che sarà la vera e propria politica ambientale della Comunità Europea. Seguirono programmi che si richiamano all'Atto Unico Europeo, il quale introduce i principi della "sussidiarietà" e del "chi inquina paga". Segue il Trattato di Maastricht, entrato in vigore il 1° gennaio 1993.

Nel successivo Trattato di Amsterdam sono affermati i seguenti principi cardine:

- Il Principio della precauzione: trova nella Conferenza di Rio de Janeiro del 1992 la sua prima affermazione. Tale principio, contenuto nell'articolo 15 della Dichiarazione di Rio, afferma quanto segue: "Ove vi siano minacce di danno serio o irreversibile, l'assenza di certezze scientifiche non deve essere usata come ragione per impedire che si adottino misure di prevenzione della degradazione ambientale". Esso sembra quindi esprimere il saggio consiglio per cui "è meglio prevenire che curare", ma in realtà sostiene che non si devono applicare i risultati della ricerca scientifica fino a che non si sia sicuri della loro assoluta non pericolosità per l'ambiente. Attenzione al tema della cautela viene anche rivolta dall'art. 172.4 Trattato CE. L'Unione Europea ratifica il principio di precauzione nella forma seguente: "Quando un'attività crea possibilità di fare male alla salute umana o all'ambiente, misure precauzionali dovrebbero essere prese, anche se alcune relazioni di causa-effetto non sono stabilite dalla scienza". Funzione del principio di precauzione è la scelta, tra due o più orientamenti scientifici contrapposti, di quello che predilige le modalità più caute ed attente nella risoluzione di un problema.
- Principio dell'azione preventiva: secondo la Comunità Europea il criterio in esame deve conformarsi ai generali principi della "buona gestione dei rischi", ovvero alla proporzionalità, coerenza, non discriminazione e all'analisi di vantaggi e svantaggi derivanti dalla scelta di agire o non agire sulla base della stabilità o meno delle misure da adottare, tenendo conto

dell'evoluzione scientifica disponibile.

- Principio della correzione, in via prioritaria alla fonte, dei danni causati all'ambiente: i danni arrecati all'ambiente devono essere eliminati al più presto. Tale principio regola una serie di questioni quali il controllo di sicurezza ambientale ovvero il contrassegno di quei prodotti che non contribuiscono ad aumentare l'inquinamento.
- Principio del "chi inquina paga": dopo la precauzione e l'azione preventiva si ricorre alla correzione. La ratio del principio è quanto mai chiara: tutti i costi inerenti alle misure, cautelative o correttive, da doversi adottare ai fini della salvaguardia dell'ambiente ricadranno sotto la responsabilità del soggetto che li ha determinati.

Per quanto riguarda il nostro paese, possiamo distinguere 5 periodi nell'attività legislativa italiana in materia ambientale:

1. Dagli anni '30 alla metà degli anni '60: i concetti di ambiente e di inquinamento non assumono un rilievo proprio e la loro tutela viene considerata solo in virtù di ulteriori scopi da perseguire. Tipico esempio è la legge sulla pesca del 1931, nel quale si stabilisce il divieto di gettare o infondere nelle acque materie atte a stordire o uccidere i pesci: è evidente che ciò che si vuole proteggere non è la purezza delle acque, ma l'ittiofauna e la possibilità di esercitare la pesca (in ultima istanza, l'attività commerciale umana).
2. Dal 1966 al 1987: nel 1966 viene emanata la prima legge contro l'inquinamento che si occupa, in particolare, dell'inquinamento atmosferico provocato dalle industrie e dal traffico. Si muovono i primi passi sul piano europeo con la nascita di numerose norme. Nel 1976 viene emanata la prima legge sulla tutela delle acque, la cosiddetta Legge Merli. Storicamente prima legge italiana sull'inquinamento idrico, ha sostituito la precedente normativa, estremamente dispersiva tra le leggi in materia di igiene e sanità, pesca, acque e impianti elettrici e miniere. Tale normativa si struttura in diversi punti: 1) ambito e finalità della legge; 2) competenze; 3) piani di risanamento; 4) regolamentazione degli scarichi. Ancora, nel 1986 viene emanata la Legge Galasso a difesa dell'ambiente e del paesaggio. Nello stesso anno nasce il Ministero dell'Ambiente.
3. Dal 1987 al 1993: in questo periodo vengono emanate molte leggi, spesso in

contraddizione fra loro.

4. Dal Novembre 1993 al 1997 Questo periodo ha inizio nel momento in cui il Governo Ciampi ritenne che, per accelerare la ripresa economica del paese, fosse necessario eliminare i vincoli e le limitazioni imposte dalla normativa ambientale, andando così contro le direttive comunitarie. Si riscrisse la legge Merli, depenalizzando il settore degli scarichi civili e delle pubbliche fognature e furono create le categorie di "residui" e di "rifiuti" e nel 1994 fu emanata la cosiddetta Legge Galli (L.36/1994) recante "Disposizioni in materia di risorse idriche".
5. Dal Febbraio 1997 ed ancora in corso: questo periodo si apre con l'emanazione del decreto legislativo sui rifiuti, e le sue successive modifiche ed integrazioni, fino a giungere al D.lgs 152/2006 che disciplina i diversi settori ambientali. Lo sviluppo della legislazione ambientale è stato lento e difficoltoso nel corso del tempo. Una volta sancito il valore dell'ambiente in quanto risorsa, si afferma il giudizio per cui il miglioramento della salubrità dell'ecosistema sia un dovere dell'uomo e della società tutta. Percorrendo i passi del progressivo sviluppo normativo circa l'ambiente, è stato messo in luce come, via via che si ampliava la coscienza e la conoscenza della materia, questa si faceva più specifica e dettagliata nei diversi settori che la compongono.

4.3. QUADRO ECOTOSSICOLOGICO IN ITALIA

La prima legge italiana a trattare in qualche modo di tossicità fu la legge 319/76 la cosiddetta Legge Merli, riscritta nel 1993. Successivamente con il Decreto Legislativo 11 maggio 1999, n. 152, aggiornato con il D.Lgs. 18 agosto 2000, n. 258 (che recepisce le direttive 91/271/CEE "trattamento delle acque reflue urbane" e 91 /676/CEE "protezione delle acque dall'inquinamento provocato dai nitrati provenienti da fonti agricole") e completamente integrato nella normativa 152/2006, anche il nostro paese si è dotato di sistemi di biomonitoraggio ambientale. Questa normativa sostanzialmente comporta l'abrogazione di quelle precedenti (Merli, acque da potabilizzare, di balneazione, idonee alla vita dei pesci, destinate alla vita dei molluschi) e delega alle Regioni il compito di identificare, per ciascun corpo idrico, la classe di qualità di appartenenza, in funzione di un monitoraggio e della classificazione delle acque in funzione di precisi obiettivi di qualità

ambientale. Senza entrare in eccessivi dettagli, per i corpi idrici questi obiettivi prevedono di definire:

- Stato ecologico (“espressione della complessità degli ecosistemi acquatici e della natura fisica e chimica delle acque e dei sedimenti, delle caratteristiche del flusso idrico e della struttura fisica del corpo idrico, considerando comunque prioritario lo stato degli elementi biotici dell’ecosistema”), sulla base di parametri chimici e fisici di base relativi al bilancio dell’ossigeno e allo stato trofico. Per i corsi d’acqua, deve essere inoltre applicato l’Indice Biotico Esteso (Ghetti, 1997), basato sull’inventario della comunità macrobentonica, nonché la rilevazione e valutazione degli elementi biologici e morfologici.
- Stato chimico (definito in base alla presenza di microinquinanti ovvero di “sostanze chimiche pericolose”). Prevede quindi che venga verificato il rispetto di limiti di concentrazione, stabiliti in base a LC_{50} o EC_{50} su tre livelli trofici, completati da studi sui sedimenti e su effetti esercitati sull’ambiente.
- Stato ambientale (“grado di scostamento rispetto alle condizioni di un corpo idrico di riferimento”). Come abbiamo già visto, esistono a questo proposito difficoltà obiettive per definire tali condizioni di riferimento. Il Decreto apparentemente supera questo problema perché i corpi idrici di riferimento possono essere identificati “anche in via teorica”. Complessivamente, in una prima fase conoscitiva della durata di 24 mesi, sarà dunque necessario classificare i corpi idrici superficiali in 5 categorie: elevato, buono, sufficiente, scadente, pessimo

L’applicazione di test ecotossicologici è prevista sia per i corpi idrici indicati nel Decreto, sia per gli scarichi di cui si occupa lo stesso impianto normativo negli allegati tecnici, in particolar modo nell’Allegato 5.

Per la classificazione della qualità dei corsi d’acqua è prevista, in primo luogo, l’analisi sulla matrice acquosa e sul biota e, qualora ne ricorra la necessità, le stesse possono essere integrate da indagini sui sedimenti e da test di tossicità.

Le determinazioni sulla matrice acquosa riguardano due gruppi di parametri, quelli di base e quelli addizionali. I primi, obbligatori, rispecchiano le pressioni antropiche tramite la misura del carico organico, del bilancio dell’ossigeno, dell’acidità, del grado di salinità e del carico

microbiologico nonché le caratteristiche idrologiche del trasporto solido. I parametri addizionali riguardano i microinquinanti organici ed inorganici; la loro selezione è effettuata dall'autorità competente caso per caso, in relazione alle criticità conseguenti agli usi del territorio, nel caso in cui, a seguito delle indagini conoscitive, si individuino sorgenti puntuali e diffuse oppure quando si abbiano informazioni pregresse ed attuali su sorgenti puntuali e diffuse che apportino una o più specie di tali inquinanti nel corpo idrico; ancora qualora dati recenti dimostrino livelli di contaminazione, da parte di tali sostanze, delle acque e del biota o segni di incremento delle stesse nei sedimenti.

Le determinazioni sul biota riguardano due gruppi di analisi:

- Analisi di base: gli impatti antropici sulle comunità animali dei corsi d'acqua vengono valutati attraverso l'Indice Biotico Esteso (IBE);
- Analisi supplementari: non obbligatorie, da eseguire a giudizio dell'autorità che effettua il monitoraggio, per un'analisi più approfondita delle cause di degrado del corpo idrico. Tra queste ultime i saggi biologici possono essere finalizzati ad evidenziare effetti a breve o lungo termine e tra di essi si segnalano:
 - Test di tossicità su campioni acquosi concentrati su *Daphnia magna*;
 - Test di mutagenicità e teratogenesi su campioni acquosi concentrati;
 - Test di crescita algale;
 - Test su campioni acquosi concentrati con batteri bioluminescenti.

Si segnala l'opportunità di effettuare determinazioni di accumulo di contaminanti prioritari (PCB, DDT e Cd) su tessuti muscolari di specie ittiche residenti o su organismi macrobentonici.

Le analisi volte alla verifica dei sedimenti sono di tipo supplementare, ossia eseguite solo per ottenere ulteriori elementi conoscitivi utili a determinare le cause di degrado ambientale di un corso d'acqua. Le autorità preposte al monitoraggio devono, nel caso, selezionare i parametri da ricercare in considerazione delle condizioni geografiche ed idromorfologiche del corso d'acqua, dei fattori di pressione antropica cui è sottoposto e della tipologia degli scarichi immessi. Qualora si prospetti la necessità di un'analisi più approfondita (volta ad evidenziare gli effetti tossici a breve o a lungo termine), si potranno effettuare dei saggi biologici sui sedimenti. Diversi gli approcci possibili ma riconducibili a tre

soluzioni fondamentali:

- Saggi su estratti di sedimento;
- Saggi sul sedimento in toto;
- Saggi su acqua interstiziale.

Ogni soluzione offre informazioni specifiche e l'applicazione congiunta di più tipi di saggio garantisce per lo più le informazioni ricercate. In via prioritaria si segnalano: *Oncorhynchus mykiss*, *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia*, *Chironomus tentans* e *Chironomus riparius*, *Selenastrum capricornutum* e batteri luminescenti.

Anche nel D.lgs 258/2000 le determinazioni sul biota riguardano le analisi di base (gli impatti antropici sulle comunità animali dei corsi d'acqua vengono valutati attraverso l'IBE) e le analisi supplementari (non obbligatorie, da eseguire a giudizio dell'autorità che effettua il monitoraggio, per una analisi più approfondita delle cause di degrado del corpo idrico). A tale scopo possono essere effettuati saggi biologici finalizzati ad evidenziare gli effetti a breve o lungo termine, tra i quali in via prioritaria si segnalano:

- Test di tossicità su campioni acquosi concentrati con *Daphnia magna*;
- Test di mutagenicità e teratogenesi su campioni acquosi concentrati;
- Test di crescita algale;
- Test su campioni acquosi concentrati con batteri bioluminescenti.

In aggiunta si segnala l'opportunità di effettuare determinazioni di accumulo di contaminanti prioritari (PCB, DDT e Cd) su tessuti muscolari di specie ittiche residenti o su organismi macrobentonici.

Riguardo alla matrice acquosa vengono presi in considerazione i parametri di base che in alcuni casi rilevano lo stato trofico e sono utilizzati per la classificazione, in altre circostanze servono a fornire informazioni di supporto per l'interpretazione dei fenomeni di alterazione. I parametri addizionali sono relativi ai microinquinanti organici ed inorganici. Anche qui la selezione dei parametri da esaminare è effettuata dall'autorità competente caso per caso, in relazione alle criticità conseguenti agli usi del territorio.

Le analisi sui sedimenti sono da considerarsi come supplementari e vengono eseguite per avere, se necessario, ulteriori elementi per determinare le cause di degrado ambientale di un corso d'acqua. Le autorità preposte al monitoraggio devono selezionare i parametri da

ricercare e, se serve, includerne altri, considerando le condizioni geografiche ed idromorfologiche del corso d'acqua, i fattori di pressione antropica cui è sottoposto e la tipologia degli scarichi immessi. Qualora sia necessaria un'analisi più approfondita, volta a evidenziare gli effetti tossici a breve o a lungo termine, si potranno effettuare anche in questo caso dei saggi biologici. Gli approcci possibili sono molteplici, ma riconducibili a tre soluzioni fondamentali:

- Saggi su estratti di sedimento;
- Saggi sul sedimento in toto;
- Saggi su acqua interstiziale.

Ogni soluzione offre informazioni peculiari e pertanto l'applicazione congiunta di più tipi di saggio spesso garantisce le informazioni desiderate. Possono essere utilizzati organismi acquatici, sia in saggi acuti che (sub)cronici. In via prioritaria si segnalano: *Oncorhynchus mykiss*, *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia*, *Chironomus tentans* e *Chironomus riparius*, *Selenastrum capricornutum* e batteri bioluminescenti.

4.4. QUADRO ECOTOSSICOLOGICO IN EUROPA

4.4.1. DIRETTIVA 2000/60/CE

L'emanazione della Direttiva 2000/60/CE si inserisce nel quadro normativo strutturatosi, nel nostro sistema, con il D.lgs 152/1999 e le sue successive modifiche. Esse si basano sugli stessi concetti e sugli stessi principi generali e lo scopo prefissato è quello di istituire, a livello nazionale ed europeo, una politica sostenibile di lungo termine per l'uso e la protezione delle acque interne, delle acque di transizione e di quelle marino costiere.

Con la Direttiva 2000/60/CE vengono definiti gli obiettivi ambientali che ogni tipologia di corpo idrico deve raggiungere. Gli strumenti atti al raggiungimento dell'obiettivo sono:

- Il recupero delle spese effettuate per la manutenzione;
- La gestione e l'utilizzazione dei servizi idrici mediante l'attivazione di un'analisi dei costi degli usi delle risorse idriche;
- L'osservanza del principio del "chi inquina paga".

La "Legge - quadro" per l'azione comunitaria in materia di acque, fissa scopi che attengono:

- Alla protezione, al miglioramento e all'impedimento di ulteriori deterioramenti dello stato degli ecosistemi terrestri e acquatici e delle zone umide direttamente

dipendenti da questi ultimi sotto il profilo del fabbisogno idrico;

- All'utilizzo idrico sostenibile fondato sulla protezione a lungo termine delle risorse idriche disponibili;
- Alla protezione rafforzata e al miglioramento dell'ambiente acquatico, anche attraverso misure specifiche per la graduale riduzione degli scarichi, delle emissioni e delle perdite di sostanze pericolose prioritarie;
- Alla graduale riduzione dell'inquinamento delle acque sotterranee impedendone contemporaneamente l'aumento;
- A mitigare gli effetti delle inondazioni e della siccità contribuendo a:
 1. Garantire una fornitura sufficiente di acque superficiali e sotterranee di buona qualità per un utilizzo idrico sostenibile, equilibrato ed equo;
 2. Ridurre in modo significativo l'inquinamento delle acque sotterranee;
 3. Proteggere le acque territoriali e marine, e realizzare gli obiettivi degli accordi internazionali in materia, compresi quelli miranti a impedire ed eliminare l'inquinamento dell'ambiente marino: con azione comunitaria ai sensi dell'articolo 16, paragrafo 3, per arrestare o eliminare gradualmente gli scarichi, le emissioni e le perdite di sostanze pericolose prioritarie al fine ultimo di pervenire a concentrazioni, nell'ambiente marino, vicine ai valori del fondo naturale per le sostanze presenti in natura e vicine allo zero per le sostanze sintetiche antropogeniche.

4.4.2. DIRETTIVA 2000/60/CE: ALLEGATO V

Tra gli allegati alla direttiva è significativo prendere in visione l'Allegato V ed in particolare il punto 1.2.6. In questo contesto vengono chiarite le procedure per la fissazione degli standard di qualità ambientale per l'acqua, i sedimenti e per il biota. A tal fine devono essere valutati (o perlomeno così è suggerito) i dati relativi agli effetti acuti o cronici di determinati fattori:

- Alghe e/o macrofite;
- *Daphnia magna* od organismi rappresentativi delle acque saline;
- Pesci.

Per fissare la concentrazione massima media annuale di tali elementi in un corpo idrico, gli Stati membri determinano dei fattori di sicurezza, secondo la natura e la qualità dei dati disponibili. A tali procedimenti segue la fase del monitoraggio dello stato ecologico e chimico dei corpi idrici. I programmi di monitoraggio e di sorveglianza, istituiti dagli Stati membri, hanno lo scopo di ottenere dati ed informazioni che, esaminati unitamente alla procedura di valutazione dell'impatto, vengono impiegati per la formulazione dei programmi di monitoraggio futuri. Queste operazioni vengono effettuate per un anno durante il periodo contemplato dal piano di gestione del bacino idrico considerando i parametri indicanti la qualità biologica, idromorfologica e fisico-chimica dello stesso nonché degli eventuali inquinanti presenti.

Sono previste altre due tipologie di monitoraggi, il monitoraggio operativo e di indagine. Il primo è effettuato al fine di stabilire lo stato dei corpi idrici che rischiano di non soddisfare gli obiettivi ambientali disposti per la sua categoria di appartenenza e al fine di valutare le variazioni degli stessi durante l'applicazione dei programmi di misure predisposti per la loro salvaguardia. Il secondo, invece, ha lo scopo di chiarire le cause del mancato raggiungimento degli obiettivi ambientali previsti per il corpo idrico esaminato e per valutare la portata e l'impatto di fonti inquinanti accidentali.

Grande attenzione è infine rivolta alla qualità biologica di tutti gli elementi facenti parte della catena alimentare (fitoplancton, composizione flora acquatica, macroinvertebrati e pesci). La frequenza con cui vengono compiuti tali monitoraggi oscilla da un minimo di 3 ad un massimo di 6 mesi. Inoltre la normativa prevede che entro il 2016, tutti gli Stati Membri dovranno raggiungere il livello di buono stato ambientale ed ecologico.

5. FARMACI

5.1. UTILIZZO DEI FARMACI IN ITALIA

“Farmaco” è un termine utilizzato per indicare una sostanza o un'associazione di sostanze aventi proprietà curative o profilattiche delle malattie umane. Il prodotto farmaceutico può essere utilizzato o somministrato sull'uomo allo scopo di ripristinare, correggere o modificare funzioni fisiologiche, esercitando un'azione farmacologica, immunologica o metabolica, ovvero di stabilire una diagnosi medica.

Il quadro del consumo farmaceutico in Italia, è reso disponibile in maniera continuativa dai Rapporti nazionali OsMed, rapporti annuali e periodici a cura dell'Istituto Superiore di Sanità, dell'AIFA (Agenzia Italiana del Farmaco), e con la collaborazione della Società Italiana di Medicina generale, e coordinato da Roberto Raschietti. Nello studio il calcolo del consumo di farmaci è fatto sulla base delle "dosi standard al giorno" (DDD, dosi definite die, che rappresentano, per ciascuna sostanza, la dose necessaria a coprire una giornata di terapia nell'adulto), (Rapporto Nazionale OsMed 2007).

I dati rivelano che negli ultimi anni vi è stato un aumento di dosi per cittadino che si aggira intorno al 52% (Paganelli M., 2008), e i farmaci del sistema cardiovascolare rappresentano in assoluto la categoria più utilizzata. Dall'analisi condotta nella popolazione a disposizione dell'OsMed, si conferma come l'età sia il principale fattore predittivo dell'uso dei farmaci. Infatti, la spesa pro capite di un assistibile di età superiore a 75 anni è di oltre 11 volte superiore a quella di una persona di età compresa fra 25 e 34 anni (la differenza diventa di circa 17 volte in termini di dosi), (Rapporto Nazionale OsMed 2007). Maggiore è il consumo di prodotti farmaceutici da parte del cittadino, più elevato è il livello di inquinamento ambientale che ne deriva. Infatti, l'abitudine di gettare farmaci scaduti sia in forma solida (comprese, capsule), sia in forma liquida (gocce, sciroppi, fiale) nel lavandino domestico o nel water comporta, ogni giorno, un grave danno per l'ambiente. Tale rilevazione è stata palesemente dimostrata da studi condotti sui fanghi di depurazione in America nei quali è stata riscontrata un'alta concentrazione di ormoni, antibiotici, psicofarmaci ed altre sostanze dannose per l'Ecosistema (Substance Abuse and Mental Health Services Administrator, 2006).

Informazione di notevole rilevanza anche sanitaria oltre che ambientale, in quanto i fanghi

provenienti dagli impianti di depurazione vengono spesso adoperati come concimi agricoli. Da ciò consegue il rischio legato all'assimilazione di sostanze farmacologiche tramite alimentazione (Ferrigno A., 2007).

5.2. INQUINAMENTO PRODOTTO DA FARMACI

5.2.1. RISCHI PER L'AMBIENTE E PER L'UOMO

I farmaci, oltre ad esercitare effetti benefici, possono produrre effetti avversi sull'uomo e sull'ambiente. Le concentrazioni riscontrate (alcuni mg/m³ di acqua) sono di molto inferiori, però, a quelle in grado di esercitare effetti tossici "acuti". Per l'uomo il rischio legato all'assunzione di acqua potabile contaminata è molto improbabile: calcolando un'assunzione di 2L di acqua contaminata da farmaci al giorno per 70 anni, si rimane sempre al di sotto di una singola dose terapeutica (Zuccato E., 2004). Ma non va sottovalutata l'esposizione continuata nel tempo, tramite l'acqua e la catena alimentare. Rimangono quindi da accertare i possibili effetti avversi derivanti dall'esposizione cronica, ad esempio le allergie, oppure l'antibiotico-resistenza da parte di ceppi batterici patogeni (Kummerer K., 2004). Più provate le implicazioni ambientali, che riguardano in particolare i farmaci ad azione ormonale, che hanno quindi effetti sul sistema endocrino, ossia i cosiddetti "endocrine disruptors". Diminuzione della qualità dello sperma, alterazione nel comportamento sessuale e ritardo nella maturazione di rane e pesci sono alcuni degli esempi riportati in letteratura scientifica (Jobling S., 2006). Altre classi di farmaci interessati agli effetti ambientali sono gli antibiotici, in grado di modificare i batteri del terreno con le loro azioni di tipo selettivo, e i farmaci antitumorali, che sono spesso potenti agenti citostatici o citolitici.

5.2.2. REGOLAMENTAZIONE

In Europa, il problema dell'inquinamento da farmaci è stato affrontato per la prima volta nel 1993, con la Normativa 93/39/CEE. Tale Normativa introduceva la necessità di segnalare ogni possibile rischio ambientale potenzialmente correlato all'utilizzo dei prodotti farmaceutici. Successivamente, l'Agenzia Europea per la Valutazione dei Farmaci, l'EMA, ha introdotto il principio della valutazione del rischio ambientale per tutti i nuovi farmaci prima di provvedere alla registrazione, e nel 1994 sono state pubblicate le linee-guida per la valutazione del rischio ambientale dei farmaci per uso umano contenenti organismi

geneticamente modificati (OGM). Era intanto iniziata anche la discussione relativa ai farmaci non-OGM, che inizialmente conglobava sia i farmaci per uso umano sia quelli per uso veterinario. I due tipi di farmaci vennero poi separati nel procedere della discussione e, nel 1997, sono state pubblicate le prime linee-guida per la valutazione del rischio ambientale dei farmaci per uso veterinario, e per quelli ad uso umano abbiamo atteso fino al 2001(EMEA CPMP., 2001). Molte, però, sono state le revisioni del documento originale, infatti, le linee-guida previste dal draft 2001 sono state successivamente riviste nel 2003 e successivamente nel 2005 (EMEA CPMP., 2005).

L'Unione Europea prevede che, per l'entrata in commercio dei farmaci, questi siano soggetti ad una valutazione del rischio ambientale (ERA, Ecological Risk Assessment).

Le linee guida messe a punto dall'EMEA prevedono una valutazione multistep che si conclude nel momento in cui sono esclusi rischi per l'ambiente. Se ciò non è possibile, allora l'autorizzazione è condizionata dall'adozione di una serie di misure di sicurezza mirate a mitigare, nei limiti del possibile, l'esposizione dell'ambiente al nuovo farmaco. In particolare sono richieste etichettature speciali con l'indicazione dei potenziali rischi ambientali che dovranno essere descritti in etichetta e nel foglietto illustrativo, con l'indicazione delle precauzioni a cui attenersi per lo stoccaggio e la somministrazione ai pazienti, e deve anche essere riportata la seguente frase: «per proteggere l'ambiente e ridurre l'inquinamento ambientale, i prodotti non utilizzati o scaduti non devono essere smaltiti con i normali rifiuti o nella rete fognaria, ma devono essere restituiti in farmacia». In nessun caso un farmaco riconosciuto pericoloso per l'ambiente sarà eliminato, ma verranno solo attivate procedure indirette per mitigare il rischio ambientale. Inoltre, per ora, nulla è previsto per quanto riguarda i farmaci già in commercio all'entrata in vigore del Regolamento, soprattutto in materia di inquinamento dei corpi idrici.

Esistono, inoltre, Normative che hanno ridisegnato la complessa materia della gestione dei farmaci, che passa dal principio dello smaltimento a quello del recupero. I farmaci scaduti o inutilizzabili rientrano nella categoria dei Rifiuti Speciali non Pericolosi, mentre vengono definiti Rifiuti Speciali Pericolosi i farmaci citotossici e citostatici.

L'articolo 45 c.3 del testo aggiornato del Decreto Legislativo 5 febbraio 1997 n°22 , recante " Attuazione delle direttive: 91 /156/CEE sui rifiuti, 91 /689/CEE sui rifiuti pericolosi e 94 /62 CEE

sugli imballaggi e sui rifiuti da imballaggio" (prima identificato come Decreto Ronchi, ora recepito nel Decreto legislativo 152/06 per un più rapido riferimento), stabilisce che i Rifiuti Speciali non Pericolosi devono essere soggetti a raccolta differenziata tramite appositi contenitori posti all'interno o all'esterno delle farmacie e delle strutture autorizzate. Devono, invece, essere smaltiti mediante termodistruzione presso impianti autorizzati di rifiuti speciali pericolosi a rischio infettivo o chimico.

Infine per la suddetta materia, si deve far riferimento anche al Decreto 26 giugno 2000, n°219: "Regolamento recante la disciplina per gestione dei rifiuti sanitari", ai sensi dell'art.45 del Decreto Legislativo 5 febbraio 1997 n° 22 – G.U. n° 181 del 4 agosto 2000.

5.2.3. POSSIBILI INTERVENTI

5.2.3.1. "GREEN PHARMACY"

La consapevolezza dei rischi correlati all'immissione nell'ambiente di migliaia di differenti sostanze chimiche, tra cui i farmaci, ha stimolato la nascita di "movimenti" di ecologismo scientifico denominato "green chemistry" e "green pharmacy". La green pharmacy è il tentativo condotto da alcuni ricercatori di coagulare un "movimento" capace di stimolare la nascita di una farmaceutica più ecocompatibile che, assieme a tutte le altre caratteristiche di un farmaco, tenga anche conto dei risvolti ambientali di ciò che produce (Daughton CG., 2003). Sembrerebbe un'iniziativa destinata a rimanere solo teorica se recentemente dalla Svezia non fossero arrivati i primi prodotti concreti. Lo "Stockolm County Council and Apoteket" e lo "Swedish Chemicals Inspectorate" hanno messo a punto un modello per la classificazione dei farmaci in base alle loro caratteristiche ecotossicologiche.

Ne è derivato un libretto in cui tutti i principali farmaci utilizzati in Svezia sono stati classificati in base alla loro azione e, secondariamente, in base ai rischi ambientali correlati al loro utilizzo (Stockolm County Council, 2006.). La pubblicazione è poi stata distribuita a tutti i medici svedesi, con il suggerimento di tener conto, per farmaci di pari attività e costo, anche delle caratteristiche ambientali, e di prescrivere ai propri pazienti quello più ecocompatibile. Il significato di questa iniziativa pilota, oltre a quello di sensibilizzare i medici prescrittori sui rischi ambientali dei farmaci, è ovviamente anche quello di "allertare" l'industria farmaceutica, affinché nella formulazione dei futuri prodotti inizi a mostrare interesse anche verso queste tematiche.

5.2.3.2. DEPURATORI PIU' EFFICIENTI

Molti centri urbani sono dotati di impianti di depurazione delle acque reflue. Gran parte di questi, però, non è in grado di incidere in maniera sostanziale sul carico di inquinanti. Molti sono i farmaci presenti nelle acque "depurate", che sono rimossi solo in maniera incompleta, o addirittura sono persistenti (Castiglioni S., 2006; Golet E.M., 2001). Dunque le acque depurate, ancora ricche di farmaci, riversandosi nelle acque superficiali di canali, fiumi e laghi contribuiscono ad un inquinamento ambientale diffuso (Zuccato E., 2005). È quindi chiaro che una maggiore efficienza degli impianti di trattamento delle acque reflue sarebbe teoricamente in grado di risolvere il problema alla radice, o perlomeno di attenuarlo.

Un depuratore "classico" è un impianto dotato di due sistemi di depurazione, primario e secondario, rispettivamente di tipo meccanico e biologico. La possibile risoluzione del problema è l'associazione di un sistema di depurazione "terziario" specificatamente diretto alla rimozione o alla degradazione di inquinanti recalcitranti come i farmaci. In alcuni impianti pilota si stanno provando, con ottimi risultati, processi innovativi di tipo chimico, come ad esempio l'ozonizzazione, o di tipo fisico, come le membrane microfiltranti (Huber M., 2002).

Nel frattempo l'educazione e l'informazione di medici e pazienti, per uno smaltimento appropriato e per un uso proprio e consapevole dei farmaci, possono contribuire a ridurre il carico di sostanze attive che si riversano nell'ambiente, mitigandone quindi i potenziali rischi.

5.3. TEST ECOTOSSICOLOGICI SUI FARMACI

Su questa tematica sono disponibili numerosi dati di letteratura, anche se riguardano indagini in genere estese a pochi farmaci e su scala spaziale limitata. Ciò è dovuto anche al fatto che i saggi ecotossicologici presentano alcune difficoltà sia pratiche che teoriche, dato che le concentrazioni dei singoli farmaci nell'ambiente acquatico sono molto lontane dalle dosi farmacologiche di effetto.

Inoltre, i saggi standardizzati su crostacei, alghe, etc., potrebbero non essere sufficientemente sensibili per evidenziare effetti di molecole progettate e calibrate nelle quantità e nella struttura in modo da non risultare xenobiotiche. In questo senso si stanno

sviluppando saggi alternativi su organismi e su gruppi di organismi possibilmente più sensibili. Per di più, occorre rilevare che gli studi sono in genere rivolti alla valutazione di singole sostanze, mentre i dati di monitoraggio riguardanti i corpi idrici superficiali si spingono verso la valutazione degli effetti di miscele di farmaci (Bottoni P., 2005).

Nonostante l'esiguità dei dati ecotossicologici, in alcuni studi è stato possibile stabilire che composti come ibuprofen, acido acetilsalilico, acido mefenamico, aminotriptilina, amoxicillina, destropropossifene, ossitetraciclina, paracetamolo/acetaminofen, propranololo e tioridazina sono presenti nelle acque superficiali a livelli di rischio non trascurabile per gli organismi acquatici (Tixier C., 2003).

Le prime conoscenze di episodi di contaminazione di risorse idriche dovute ai farmaci risalgono agli anni '80, sulla base di indagini condotte essenzialmente nei Paesi del Nord Europa come la Germania. In seguito le ricerche si sono estese in altri Paesi europei ed anche negli Stati Uniti e in Canada. Diverse indagini sono state condotte anche in Italia su acque fluviali (Sacher F., 2001).

Molti prodotti farmaceutici sono stati testati attraverso varie linee guida (ad esempio l'OCSE, US EPA, ISO) e utilizzando organismi di laboratorio come le alghe, zooplancton e altri invertebrati e pesci. (Fent K., 2005).

Alcuni dati sulla tossicità acuta di prodotti farmaceutici sono stati ricavati da Halling-Sorensen et al. (1998) e Webb (2001), i quali hanno testato circa 100 prodotti farmaceutici umani provenienti da diversi fonti. Confrontando organismi appartenenti a diversi livelli trofici, Webb (2001) suggerisce che le alghe, ad esempio, sono state più sensibili rispetto a *Daphnia magna*, e soprattutto rispetto ai pesci utilizzati nei test. (Webb S.F., 2001).

Per quanto riguarda gli antiinfiammatori e analgesici, in generale, i dati sulla tossicità variano per ogni farmaco, tuttavia, diclofenac sembra essere il composto con più alta tossicità acuta all'interno della classe dei FANS, in quanto per tutti i test effettuati l'effetto è stato riscontrato anche in concentrazioni inferiori a 100 mg / L.

La tossicità acuta è stata analizzata con alghe e invertebrati (Webb S.F., 2001; Cleuvers M., 2003), fitoplancton, che è risultato il più sensibile [EC_{50} (96 h) = 14,5 mg / L (Ferrari B., 2004)] e zooplancton [più basso CE_{50} (96 h) = 22,43 mg / L (Ferrari B., 2004)]. In generale, non si riscontra la tossicità acuta con i pesci.

La tossicità acuta dei beta-bloccanti non è ampiamente studiata, con l'eccezione del propranolol. Questo composto mostra la più alta tossicità acuta rispetto agli altri beta-bloccanti. Questo può essere spiegato dal semplice fatto che il farmaco propranolol è un forte stabilizzatore di membrana, mentre gli altri beta-bloccanti indagati non lo sono (Doggrell S.A., 1990; Huggett D.B., 2002).

Ancora più limitati sono i dati di tossicità cronica, ricavati da test che misurano, come effetti finali, la crescita e la riproduzione dei bioindicatori usati, in seguito al contatto con la sostanza da esaminare (Crane M., 2006). Sono stati testati vari antibiotici mediante l'utilizzo di microorganismi come *Vibrio fischeri* (Backhaus T., 1999), *P. subcapitata* (Webb S.F., 2004), pesci ed anfibi (Huggett D.B., 2003-2004).

Ci sono solo pochi studi relativi agli effetti di miscele di prodotti farmaceutici. Cleuvers (2003, 2004) ha valutato il potenziale ecotossicologico di alcuni farmaci antiinfiammatori utilizzando diversi organismi acquatici. Una miscela di FANS (diclofenac, ibuprofen, naprossen e acido acetilsalicilico) è stata valutata utilizzando i bioindicatori *Daphnia magna* e le alghe.

La tossicità della miscela è stata trovata a concentrazioni in cui il singolo composto non ha mostrato alcun effetto, o comunque in minima parte. Il che significa che, in questo caso, le concentrazioni di ogni composto comportano un effetto additivo.

5.4. FARMACI TESTATI

I farmaci testati sono stati: diclofenac e ibuprofen (antiinfiammatori e analgesici); erythromycin, sulfamethoxazole, amoxicillin e ofloxacin (antibiotici); atenolol e propranolol (beta-bloccanti); carbamazepine (anticonvulsione).

5.4.1. DICLOFENAC – ANTIINFIAMMATORIO

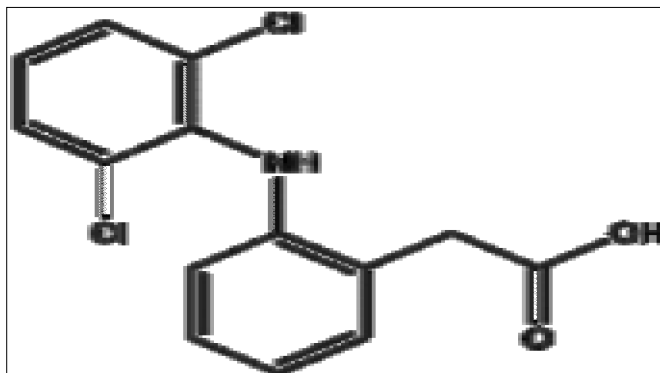


Figura 5.1: struttura molecolare di diclofenac

Diclofenac è il principio attivo contenuto in alcuni antibiotici anti-infiammatori non steroidei (FANS), come ad esempio il Voltaren. Tali farmaci sono detti "analgesici periferici" e agiscono sul metabolismo dell'acido arachidonico (acido eicosapentenoico), precursore di molecole coinvolte nel processo infiammatorio quali prostaglandine (PG), prostaciline (PC), trombassani (TX) e leucotreni (LT). I FANS bloccano in maniera più o meno reversibile un enzima, la cicloossigenasi, esistente in due forme: COX-1, prodotto ubiquitario in condizioni fisiologiche, e COX-2, sintetizzato in maniera inducibile e quasi assente se non in attiva fase infiammatoria. Gli antiinfiammatori hanno una selettività differente verso COX-1 e COX-2; tale specificità è alla base per la ricerca farmacologica e per la comprensione e la risoluzione dei problemi legati alla tossicità di alcuni di questi farmaci (Brogden R.N.,1980). Un aspetto piuttosto comune è una certa lesività verso mucose, specialmente quella gastrointestinale. I FANS esistono in diverse forme: per uso topico in pomate, gel, unguenti e creme dermatologiche, in compresse e capsule per via orale, in sistemi per assorbimento transdermico (comunemente definiti cerotti medicati) o in supposte. Essi vengono prescritti come antidolorifici generici, come antilogistici, per diminuire l'infiammazione in patologie muscolo-scheletriche, reumatologiche, articolari e similari, nonché in post-chirurgia, e infine come antipiretici per diminuire la temperatura corporea in caso di febbre.

5.4.2. IBUPROFEN- ANTIINFIAMMATORIO

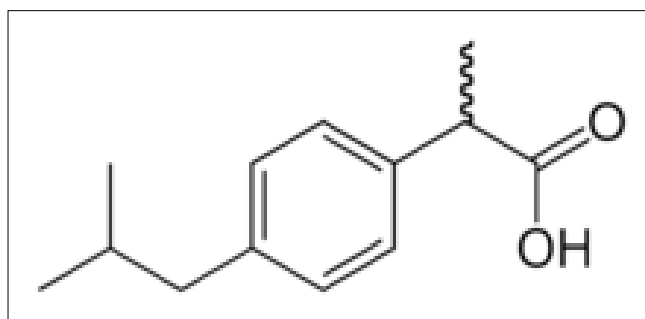


Figura 5.2: struttura molecolare di ibuprofen

Ibuprofen è un farmaco appartenente al gruppo dei FANS, con discreta attività analgesica e scarsa attività antinfiammatoria. Indicato in caso di reumatismo articolare acuto, reumatismi cronici, dolori in genere. La forma iniettabile è riservata al trattamento acuto di affezioni infiammatorie dell'apparato muscolo scheletrico (Laska E.M., 1986). Presenta effetti collaterali a carico dell'apparato gastroenterico (nausea, vomito, gastralgia, ulcera), che possono essere attenuati dall'assunzione a stomaco pieno o in associazione a gastroprotettori (prostaglandine come il misoprostol e, in minor misura, sucralfato). Deve essere sospeso 24 ore prima di un intervento chirurgico o di un'estrazione dentaria, a causa del suo effetto antiaggregante piastrinico (comune anche agli altri FANS). E' necessario evitare l'assunzione in associazione con acido acetilsalicilico o altri farmaci antinfiammatori.

5.4.3. ERYTHROMYCIN – ANTIBIOTICO

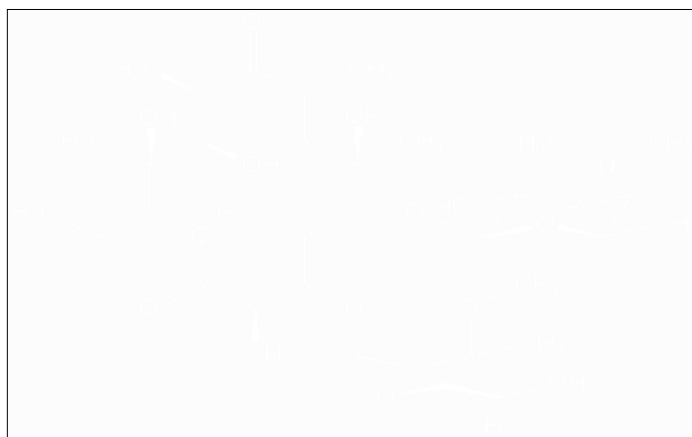


Figura 5.3: struttura molecolare di erythromycin

Erythromycin è il capostipite di un gruppo di antibiotici denominati macrolidi. Entrata in uso nel 1953, ed è ancora molto utilizzata.

Erythromycin ha uno spettro d'azione antibatterico simile a quello delle penicilline, pertanto può rappresentare un'alternativa terapeutica per i pazienti che manifestano reazioni allergiche a questa categoria di antibiotici.

I batteri sensibili a questa classe di antibiotici, e pertanto compresi nello spettro d'azione di erythromycin, sono i cocci Gram-positivi come lo *Staphylococcus aureus*, pneumococchi, streptococchi e cocci Gram-negativi. È inoltre attiva su microrganismi quali *Bordetella pertussis*, *Brucella* sp., *Mycoplasma pneumoniae* ed anche organismi intracellulari come la *Rickettsia* sp.. Per quanto riguarda la struttura chimica di erythromycin, la funzione chetonica risulta molto importante per la sua attività. Inibisce la sintesi proteica nei batteri, agendo di conseguenza come batteriostatico. Nello specifico blocca il meccanismo di traslocazione dei t-RNA che portano gli amminoacidi all'interno del ribosoma, impedendo che passino dal sito di ingresso A, al sito P e quindi al sito di uscita E. L'eritromicina si lega alla subunità 50s del ribosoma batterico bloccandolo, e impedendo così la sintesi delle proteine. Trova indicazione nel trattamento di alcune forme di enteriti, di polmonite, legionellosi, sifilide, uretrite non gonococcica, prostatite cronica, difterite, acne volgare e rosacea, e nella profilassi della pertosse (Goodman 2008). L'eritromicina viene ben assorbita per via orale, diffondendo facilmente nei tessuti, non è tuttavia in grado di oltrepassare la barriera emato-encefalica. Può inoltre essere somministrata per via parenterale. L'escrezione avviene a seguito della sua metabolizzazione a livello epatico.

5.4.4. SULFAMETHOXAZOLE-ANTIBIOTICO BATTERIOSTATICO

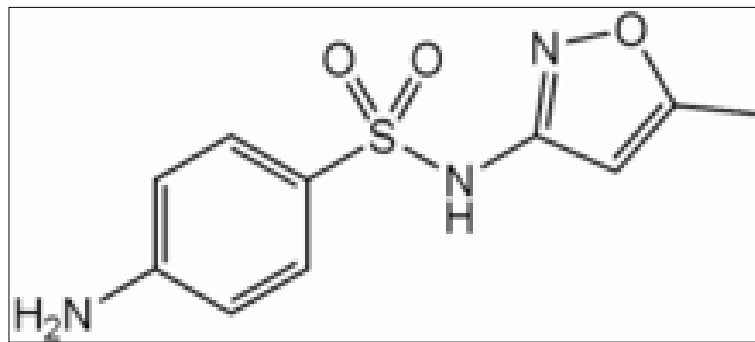


Figura 5.4: struttura molecolare di sulfamethoxazole

Sulfamethoxazole è un antibiotico batteriostatico sulfonamidico spesso utilizzato in combinazione con trimethoprim. La sua principale attività è contro le forme suscettibili di *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*. E' comunemente usato per il trattamento di infezioni del tratto urinario (McCarty J.M., 1999); inoltre può essere utilizzato in alternativa ad amoxicillin per il trattamento della sinusite.

E' un analogo strutturale ed antagonista competitivo dell'acido para-amminobenzoico (PABA). Inibisce il normale uso di questa sostanza per la sintesi dell'acido folico, un importante metabolita della sintesi del DNA, non sintetizzato dagli esseri umani, e che, per questo, deve essere integrato attraverso la dieta. Allergie ai sulfa-farmaci possono causare eruzioni cutanee, orticaria, problemi di respirazione e/o glutinazione.

5.4.5. AMOXICILLIN-ANTIBIOTICO BETA LATTAMICO

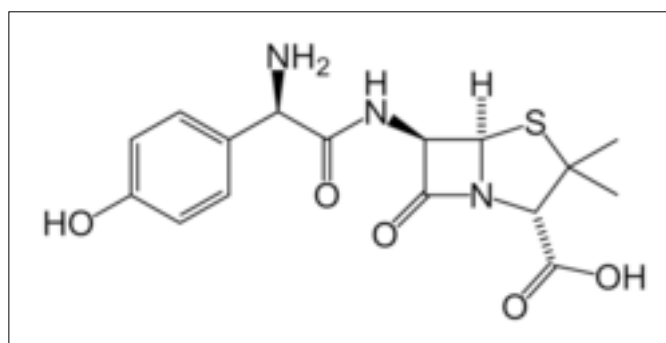


Figura 5.5: struttura molecolare di amoxicillin

Amoxicillin (INN) o amoxycillin (BAN) è il principio attivo contenuto in antibiotici beta-lattamici batteriolitici utilizzati per il trattamento delle infezioni batteriche causate da microorganismi sensibili (per es. velamox e zimox). Amoxicillin, in genere, è il farmaco più usato della classe dei beta-lattamici, perché è di facile assorbimento, in seguito a somministrazione orale. Amoxicillin è un antibiotico che appartiene alla famiglia delle penicilline. E' impiegata per curare o prevenire le infezioni quali, ad esempio, bronchiti, otiti medie e sinusiti (Goodman, 2008).

Amoxicillin agisce inibendo la sintesi delle pareti cellulari batteriche, evitando il collegamento tra le catene di peptidoglicano che costituiscono la parete cellulare dei batteri Gram-positivi. I Gram-positivi sensibili ad amoxicillin sono *Streptococcus* spp., non produttore della lattamasi, *Streptococcus pneumoniae* sensibile alla penicillina ed *Enterococcus faecalis*.

5.4.6. OFLOXACIN-FLUOROCHINOLONE

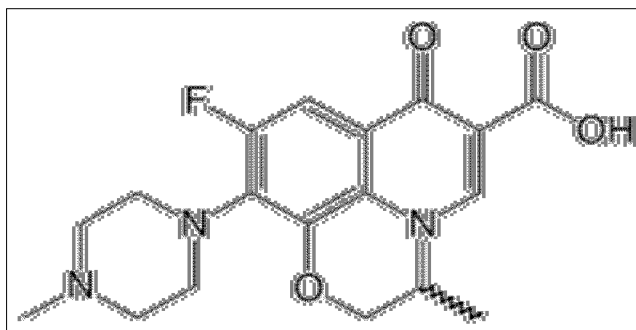


Figura 5.6: struttura molecolare di ofloxacin

Ofloxacin (venduto con il marchio Floxin negli Stati Uniti, Tarivid in Europa e in alcuni altri paesi) è un fluoroquinolone. Ofloxacin è una miscela racemica di composti chirali. L'enantiomero biologicamente attivo è venduto separatamente con il nome di levofloxacin. E' usato come trattamento per la gonorrea e come trattamento alternativo al ciprofloxacina per l'antrax.

I fluoroquinoloni, in generale, hanno una maggiore attività contro Enterobacteriaceae e sono inoltre attivi contro stafilococchi, *P. aeruginosa*, *Mycoplasma* sp., *Chlamydia* sp., e alcuni streptococchi, a eccezione della trovafloxacin, ma non sono attivi in maniera

affidabile nei confronti degli organismi anaerobi (Hammerschlag M.R., 1992). Ofloxacin, così come levofloxacin ed altri analoghi, hanno la migliore attività contro i cocci Gram-positivi. È stata notata resistenza da parte di organismi, quali *P. aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, una resistenza che si manifesta verso tutti in fluorochinoni in generale.

Ofloxacin ha effetti collaterali come tutti gli altri farmaci appartenenti allo stesso gruppo, come la rottura spontanea dei tendini, che può avvenire sia durante che dopo la terapia, anche dopo più di un anno dal trattamento.

5.4.7. ATENOLOL – BETA BLOCCANTE

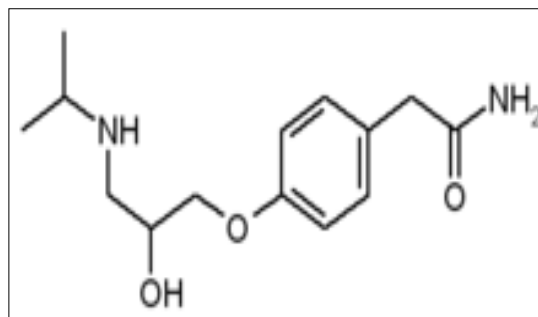


Figura 5.7: struttura molecolare di atenolol

Atenolol appartiene a un gruppo di beta-bloccanti ad effetto specifico sul cuore. Agisce regolarizzando l'attività di quest'organo senza influire sulla muscolatura delle vie respiratorie. Quindi anche i pazienti che soffrono di una malattia delle vie respiratorie (dispnea, asma) possono prendere l'Atenolol con la dovuta prudenza. Tale farmaco protegge il cuore da sollecitazioni eccessive, determinando così una diminuzione del lavoro del miocardio e un'attenuazione della reazione del cuore agli sforzi fisici e psichici. Il medico prescrive l'Atenolol per abbassare la pressione arteriosa troppo alta, in quanto questo farmaco agisce sulla muscolatura liscia delle arterie favorendo una maggiore contrazione dei vasi, e per ridurre la frequenza e l'intensità di violenti dolori costrittivi al petto che possono irradiarsi al braccio sinistro, e che si manifestano quando il cuore sotto sforzo non riceve ossigeno a sufficienza, disturbi che prendono il nome di "Angina pectoris" (Huggett, D.B., 2002).

5.4.8. PROPRANOLOL-BETA BLOCCANTE

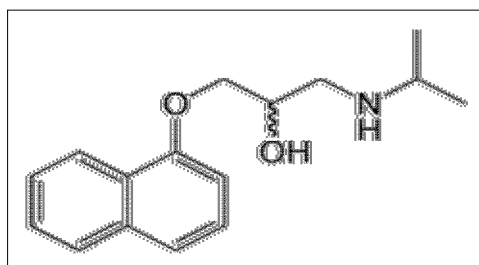


Figura 5.8: struttura molecolare di propranolol

Propranolol è un beta-bloccante non selettivo principalmente utilizzato per il trattamento dell'ipertensione. Esso è stato il primo beta bloccante che si è sviluppato con successo, ed è l'unico farmaco che si è dimostrato efficace per la profilassi delle emicranie nei bambini (Forsythe W.I., 1984). E' disponibile nella forma generica come propranololo cloridrato così come in altre forme. Il propranolol, nella forma L-propranolol, è un antagonista α_1 -adrenergico che ha la capacità di bloccare entrambi i recettori α_1 e α_2 , mentre la forma D non lo è. Tuttavia, entrambi hanno effetto anestetico locale. Oltre che per l'ipertensione e la profilassi delle emicranie, il propranolol è indicato per il controllo delle tachicardie e il tremore associati ad ansia e ipertiroidismo, per il tremore essenziale, infarto miocardico e altri disturbi vari, e attualmente, è in fase di studio come un potenziale trattamento per il post-traumatico da stress.

5.4.9. CARBAMAZEPINE-ANTICONVULSIONANTE

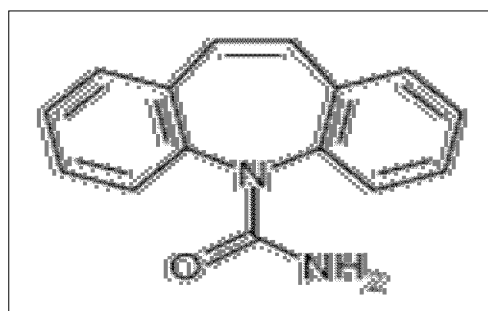


Figura 5.9: struttura molecolare di carbamazepine

Carbamazepine ("CBZ") è un anticonvulsione e stabilizzante dell'umore, usato principalmente per il trattamento di epilessia e disturbo bipolare (Read K., 2006). E' un farmaco per il SNC, che viene utilizzato per il trattamento di schizofrenia, sindrome di arto

fantasma, disordine del dolore estremo parossistico e la nevralgia del trigemino (Goodman, 2008).

Questo farmaco è noto per rendere molti contraccettivi ormonali inefficaci, per la sua azione come induttore dell'enzima citocromo P450, sistema metabolizzante di molti contraccettivi orali. Carbamazepine aumenta la produzione dell'enzima citocromo P450, che accelera la rimozione del contraccettivo dal plasma sanguigno, anche se il significato clinico di questo effetto è discutibile.

Il meccanismo d'azione di carbamazepine e dei suoi derivati è relativamente ben compreso. I canali del sodio voltaggio-dipendenti sono i pori molecolari che consentono alle cellule cerebrali (neuroni) di generare potenziali di azione, le scariche elettriche che consentono ai neuroni di comunicare a lunga distanza. Il potenziale d'azione è avviato dopo l'apertura del canale del sodio, e viene inattivato alla chiusura dello stesso. Il farmaco in questione stabilizza lo stato inattivo dei canali del sodio, il che significa che si avrà un numero minore di canali aperti, rendendo le cellule cerebrali meno eccitabili.

Comuni effetti indesiderati comprendono sonnolenza, mal di testa ed emicranie, e / o disturbi di stomaco. Inoltre Carbamazepine, in genere, diminuisce molto la tolleranza all'alcool.

6. MATERIALI E METODI

6.1. TEST CONDOTTI E METODICHE UTILIZZATE

Durante il mio lavoro di tesi ho testato i seguenti prodotti farmaceutici: amoxicillin, ofloxacin, erythromycin, sulfamethoxazole, ibuprofen, diclofenac, atenolol, propanolol e carbamazepine, mediante l'utilizzo di tre bioindicatori, quali *Daphnia magna*, *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Lepidium sativum*.

La metodica seguita per condurre il test di tossicità acuta con *Daphnia magna* è l'ISO 6341/1999; per la conduzione del saggio di inibizione della crescita algale con *Pseudokirchneriella subcapitata* ho considerato la metodica ISO 8692/1989; per l'allestimento del test di fitotossicità con *Lepidium sativum* ho preso in considerazione la metodica IRSA 1983.

6.2. SCELTA DELLE CONCENTRAZIONI SAGGIATE

Al fine di scegliere le concentrazioni dei prodotti farmaceutici da saggiare ho eseguito un primo screening a varie concentrazioni partendo da un farmaco qualsiasi ad una quantità pari a 1000mg/L.

A partire da tale soluzione ho poi testato il campione a concentrazioni pari a 800mg/L, 600mg/L, 400mg/L e 200mg/L.

Tutte le risposte del 100% di tossicità, durante la prova, andavano a posizionarsi in un range di valutazione tra 1000mg/L e 600mg/L, e si osservavano, invece, effetti intermedi a partire da concentrazioni di 600mg/L fino a 400mg/L, e ciò mi ha permesso di scegliere la soluzione madre dalla quale partire con diluizioni 1:2, ovvero 350mg/L.

Successivamente, per motivi stechiometrici, ho scelto di arrotondare a 320mg/L, quantità utilizzata per poter iniziare ad eseguire i vari test, i quali sono stati ripetuti 10 volte per ogni farmaco e per ciascun bioindicatore.

6.3. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Le concentrazioni delle soluzioni dei farmaci testati sono state preparate partendo dalle seguenti soluzioni madre:

- Per il farmaco amoxicillin: 320 mg/L;
- Per ofloxacin: 320 mg/L;
- Per erythromycin: 320 mg/L;
- Per sulfamethoxazole: 320 mg/L;
- Per ibuprofen: 320 mg/L;
- Per diclofenac: 320 mg/L;
- Per atenolol: 320 mg/L;
- Per propranolol: 320 mg/L;
- Per carbamazepine: 320 mg/L.

Materiali e strumentazioni utilizzati per l'allestimento delle soluzioni:

- Bilancia analitica da laboratorio (precisione 0,0001 g);
- Matracci graduati in vetro pirex con collo liscio da 1L;
- Cilindro graduato in vetro borosilicato da 1L;

- Imbuti in plastica per analisi;
- Pipette graduate in vetro pirex da 1 mL;
- Beute in vetro pirex a collo stretto da 500 mL;
- Acqua bidistillata ultrapura;
- Etanolo 96% v/v ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) per usi di laboratorio;

L'allestimento dei campioni testati è stato effettuato all'interno della cappa chimica, al fine di mantenere una condizione di sterilità durante il lavoro, e per evitare turbolenze indesiderate, facilitando, così, le micropesate dei prodotti farmaceutici.

Per ogni farmaco considerato ho pesato una quantità pari a 320 mg mediante bilancia analitica ed in seguito l'ho portata in soluzione con acqua bidistillata ed etanolo al 96%, fino ad un volume totale di 1L (al fine di garantire la completa solubilizzazione del farmaco ho aggiunto fino ad un massimo di 4 mL di etanolo, quantità utilizzata per l'amoxicillin, medicinale più difficile da solubilizzare in acqua). Da ogni soluzione denominata "soluzione madre" ho prelevato 250 mL e li ho aggiunti in una beuta da 500 mL; ho poi aggiunto acqua bidistillata fino ad ottenere una soluzione con una concentrazione pari a 160 mg/L. Ho proceduto in questo modo fino ad ottenere le altre concentrazioni necessarie, le quali ho poi testato con i bioindicatori *Daphnia magna*, *Lepidium sativum* e *Pseudokirchneriella subcapitata*.

Prima di effettuare i test ho misurato il valore di conducibilità elettrica specifica e il pH di ciascun campione allestito dopo l'aggiunta dei cinque sali necessari per evitare un'eventuale carenza di micronutrienti, e dopo un'eventuale correzione del pH, compreso tra 7 e 8 (pH ottimale per i bioindicatori).

Per eseguire il test di tossicità acuta con *Daphnia magna*, il cui end point è rappresentato dalla percentuale di organismi immobili, ho aggiunto una quantità di ciascun sale pari a 250•L in ogni campione allestito, per poter arrivare ad un valore di conducibilità elettrica specifica prossimo a quello dell'acqua di allevamento utilizzata come controllo negativo (282•S).

Per l'allestimento del test di germinazione ed allungamento radicale condotto con *Lepidium sativum*, in ogni campione ho aggiunto una quantità di ciascun sale pari a 60•L, al fine di

raggiungere un valore di conducibilità prossimo a quello del controllo negativo.

Per quanto riguarda l'allestimento del test di inibizione di crescita algale condotto mediante l'utilizzo dell'alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, ho aggiunto una quantità pari a 250•L di ciascun sale in ogni campione, al fine sempre di ottenere un valore di conducibilità elettrica simile a quello riscontrato nel terreno algale utilizzato come controllo nel test di tossicità.

FARMACI	SOLUBILITA' IN ACQUA	BIBLIOGRAFIA
Ibuprofen	21mg/L (25 °C)	Clarke's isolation and identification of drugs, second edition 1985
Diclofenac	>9mg/mL (25°C)	Clarke's isolation and identification of drugs, second edition 1985
Carbamazepine	17.7mg/L (25 °C)	Clarke's isolation and identification of drugs, second edition 1985
Amoxicillin	1mg/mL	Analytical profiles of drug substances and excipients, Volume 23, Harry G.Brittain
Ofloxacin	28.3mg/mL	Clarke's isolation and identification of drugs, second edition 1985
Erythromycin	1.440mg/L (25°C)	Clarke's isolation and identification of drugs, second edition 1985
Atenolol	13.5mg/mL	Clarke's isolation and identification of drugs, second edition 1985
Propranolol	61.7mg/L (25 °C)	Clarke's isolation and identification of drugs, second edition 1985
Sulfamethoxa- zole	610mg/L (37 °C)	Clarke's isolation and identification of drugs, second edition 1985

Tabella 6.1: solubilità in acqua dei diversi farmaci testati.

6.4. VALUTAZIONE DELLA TOSSICITA' ACUTA CON DAPHNIA MAGNA

Il saggio di tossicità acuta con *Daphnia magna* permette di calcolare l'EC₅₀ e cioè la concentrazione di un prodotto, o la diluizione di una soluzione, che provoca, in un tempo dato (24- 48 ore), l'immobilizzazione del 50% degli organismi usati per il saggio.

I neonati di *Daphnia magna*, di età non superiore alle 48 ore, sono esposti a diverse concentrazioni della sostanza da analizzare o a diverse diluizioni di essa.

A tempi prestabiliti si rileva il numero di daphnidi immobili o che presentano una modifica nel loro modo abituale di nuotare.

6.4.1. MORFOLOGIA

Daphnia magna (Fig 6.1), crostaceo d'acqua dolce, appartenente alla classe Brachiopodi, ordine Cladoceri, è un organismo di piccole dimensioni (non supera i 5 mm di lunghezza) che presenta un corpo di forma ovale lateralmente compresso. E' caratterizzato da una struttura bivalve, saldata dorsalmente detta carapace, che racchiude l'intero organismo, ad eccezione del capo.



Fig 6.1: *Daphnia magna*

Questo presenta un singolo occhio composto, sessile, fortemente pigmentato, un ocello di minori dimensioni e due paia di antenne, di cui le seconde, bramosi e molto sviluppate, hanno funzione natatoria.

La trasparenza del carapace permette di osservare alcuni organi interni, quali il cuore, localizzato dorsalmente nella regione postcefalica, l'intestino medio, chiaramente visibile quando contiene materiale alimentare e gli ovari, situati lateralmente ad esso. La regione toracica, anch'essa racchiusa nel carapace, è dotata centralmente di una serie di 5 appendici (arti toracici) provvisti di setole, a funzione filtrante, deputate alla raccolta delle particelle alimentari disperse in acqua. Queste ultime una volta filtrate, sono trasferite all'apertura orale, triturate dall'apparato boccale e passate all'intestino per la digestione che può durare dai 30 minuti alle 3 ore. All'addome apodo, segue un post-addome ed una furca.

L'accrescimento di *Daphnia magna* avviene per stadi o mute, in modo discontinuo, con rigetto ad ogni fase, del vecchio esoscheletro, che viene sostituito con uno di nuova formazione. Nella femmina sessualmente matura l'esoscheletro viene abbandonato dopo ogni parto.

Tra maschi e femmine esistono forti differenze di forma, tra cui, la più evidente è

rappresentata dalla taglia: le femmine presentano maggiori dimensioni rispetto ai maschi che in fase adulta raggiungono la lunghezza massima di 2-3 mm.

Il ciclo vitale di *Daphnia magna* è di 60-100 giorni, a 20 °C. In esso possono essere descritte due modalità di riproduzione che dipendono dalle condizioni ambientali: quando queste sono favorevoli, il popolamento è costituito esclusivamente da individui di sesso femminile, che si riproducono per partenogenesi e dalle cui uova schiudono altre femmine in grado di riprodursi a loro volta con lo stesso meccanismo. Le uova, maturate nei due ovari, passano nella camera d'incubazione localizzata dorsalmente, dove completano lo sviluppo nell'arco di tempo compreso tra 2-3 giorni.

Poco dopo il rilascio dei neonati, la femmina muta e depone un nuovo gruppo di uova nella camera di incubazione riattivando il ciclo descritto. Entro 7-10 giorni dalla nascita, *Daphnia magna* dà luogo alla prima schiusa, composta in media da una decina di individui. Il numero di neonati aumenta nelle schiuse successive, generalmente non oltre la quinta, collocandosi fra 20- 50 individui in dipendenza delle condizioni ambientale e dallo stato di nutrizione della madre.

In condizioni ambientali sfavorevoli, da alcune uova partenogenetiche possono svilupparsi individui di sesso maschile e contemporaneamente, alcune femmine possono produrre un diverso tipo di uova, in numero massimo di due, che possono essere fecondate dai maschi. A fecondazione avvenuta il carapace della femmina "sessuata", in corrispondenza della camera di incubazione, si scurisce ed ispessisce, avvolgendo le uova fecondate in una struttura protettiva detta ephippio che verrà abbandonata alla successiva muta, unitamente all'esoscheletro. Dall'ephippio, potranno schiudere uno, o più raramente, due organismi di sesso femminile. Gli individui che hanno partecipato alla fase sessuata, possono riprendere la normale riproduzione partenogenetica, in condizioni ambientali ristabilite (ISO 8020-99).

6.4.2. STRUMENTAZIONE

Oltre alla normale strumentazione di laboratorio, sono necessari:

- Un sistema d'illuminazione che consenta di ottenere 1000 lux a livello del piano di lavoro, dove sono poste le vasche di allevamento fornito di temporizzatore per il controllo del fotoperiodo;
- Un sistema di termoregolazione atto al mantenimento della temperatura nell'ambito

di 20 ± 2 ° C;

- Un sistema di areazione a bassa portata e pressione fornito di diffusori;
- Un misuratore di ossigeno disciolto.

Tutti gli accessori destinati ad entrare in contatto con l'acqua d'allevamento non devono rilasciare sostanze tossiche.

6.4.3. TERMOREGOLAZIONE

La temperatura per il mantenimento di *Daphnia magna* è di 20 ± 2 ° C.

6.4.4. ILLUMINAZIONE

Le vasche di allevamento sono state mantenute con un'illuminazione di 1000 lux, ricavata da lampade fluorescenti del tipo "cool-white", con indice di resa cromatica • 90 e con un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 di buio.

6.4.5. OSSIGENAZIONE

Nelle vasche d'allevamento è stata mantenuta una concentrazione di ossigeno superiore a 6 mg/L, insufflando aria mediante dei diffusori. Eventuali contaminanti presenti nell'aria utilizzata sono stati rimossi per passaggio su cartuccia di carbone attivo o altro materiale adsorbente.

6.4.6. ALIMENTAZIONE E MANTENIMENTO

La dieta per il mantenimento in coltura di *Daphnia magna*, è costituita da due organismi unicellulari: l'alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata* ed il lievito *Saccharomyces cerevisiae*.

Sia la sospensione algale che quella di lievito sono state somministrate quotidianamente in quantità tali da assicurare una densità nelle vasche di circa 300.000 cellule /mL per ciascuno dei due organismi. La somministrazione può avere luogo a giorni alterni e, in questo caso, i volumi delle sospensioni cellulari vanno raddoppiati.

Il rinnovo parziale e bisettimanale dell'acqua nelle vasche, come anche il controllo della densità ad un massimo di circa 100 individui/L, costituiscono condizioni necessarie per una corretta conduzione dell'allevamento. A tal fine, sono stati trasferiti periodicamente (ogni

15-20 giorni) gli organismi ad una vasca contenete cibo e mezzi freschi (Marchetti R., 1991). Il nostro allevamento è costituito da almeno 3 vasche da 2L di daphniae adulte partorienti e almeno di 4 vasche di crescita (Fig. 6.3).



Fig. 6.3: Vasche per l'allevamento di *Daphnia magna*

6.4.7. COLTURA ALGALE

La cloroficea *Pseudokirchneriella subcapitata* è stata allevata in un mezzo di coltura preparato con acqua bidistillata o Milli Q filtrata su membrana da 0.22 μm con l'aggiunta delle seguenti soluzioni saline:

NaNO_3	25.500 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	14.700 mg/L
K_2HPO_4	1.044 g/L
NaHCO_3	15.000 g/L
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	12.164 g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.410 g/L
H_3BO_3	185.520 mg/L
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	415.380 mg/L
ZnCl_2	3.270 mg/L
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.428 mg/L
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.012 mg/L
$\text{Na}_2\text{MO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7.260 mg/L

FeCl ₃ ·6H ₂ O	160.000 mg/L
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	300.000 mg/L

Il mezzo di coltura è ottenuto diluendo 2 ml di ciascuna delle quattro soluzioni saline in 2 litri d'acqua bidistillata o Milli Q filtrata. Il mezzo è stato inoculato in modo da ottenere una densità algale di circa 200.000 cellule/mL. Le alghe sono state incubate a 25 ± 1 ° C con un'illuminazione di circa 4000 lux fornita da lampade fluorescenti "cool-white" con fotoperiodo di 16 ore di luce. La sospensione algale è stata inoltre mantenuta in agitazione continua insufflando aria filtrata per circa 5-6 giorni in modo da ottenere una densità cellulare pari a circa 9-10 milioni di cellule/ml. La biomassa algale è stata separata dai residui del mezzo di coltura mediante centrifugazione (400 RCF per 5-10 minuti). Il surnatante viene scartato e le alghe raccolte possono essere conservate al buio alla temperatura di 4 °C. In tali condizioni le cellule algali si mantengono vitali per oltre 30 giorni e possono essere utilizzate per inoculare la coltura successiva.

6.4.8. SOSPENSIONE DI LIEVITO

Il lievito *Saccharomyces cerevisiae*, reperibile in confezioni commercializzate per la panificazione, viene disperso in acqua di durezza 30-50 mg CaCO₃/L ottenuta per miscelazione dell'acqua di allevamento con bidistillata o Milli Q.

La densità di impiego è di circa 100 milioni di cellule/mL.

Anche la sospensione di lievito è conservabile al buio ed alla temperatura di 4°C.

6.4.9. ACQUA PER L'ALLEVAMENTO

Per l'allevamento della *Daphnia* le acque di rete non clorate, di falda o di un corpo idrico superficiale sono tutte potenzialmente utilizzabili purché non siano contaminate. Sono da preferire quelle che presentano una sufficiente stabilità delle caratteristiche chimico-fisiche. Qualunque sia l'acqua prescelta, l'aerazione per 24 ore ed un trattamento con carbone attivo, preceduti nel caso di acque superficiali da filtrazione su membrane di 0,45 µm, assicurano un netto miglioramento della qualità in modo così da eliminare altri organismi che potrebbero svilupparsi nelle vasche di allevamento e competere con le *Daphniae* per spazio ed alimento.

Se necessario, l'acqua trattata va corretta in alcuni dei suoi costituenti maggiori per ottenere approssimativamente una durezza di 150 mg CaCO₃/l, un rapporto Ca /Mg = 4 e Na/K = 10.

La diluizione è stata effettuata con acqua deionizzata o distillata, filtrata su carbone attivo, o con acqua MilliQ, mentre gli aumenti di concentrazione si ottengono per aggiunta di sali di grado analitico (CaCl₂, MgSO₄, KCl...).

Nell'allestimento di una metodica opportuna, ci siamo però resi conto che l'acqua del MilliQ risultava tossica per le Daphniae, per cui è stata sostituita con acqua bidistillata Carlo Erba. Inoltre, in caso di dubbi sulla qualità dell'acqua disponibile è comunque opportuno utilizzare "acqua artificiale" a composizione ionica nota (Tab. 6.2).

IONI	Ca	Mg	Na	K	HCO ₃	SO ₄	Cl	N	P	Si	Fe
Mg/L	53.7	15	3.75	3.1	152.5	59.23	1.8	5	0.45	2.3	0.09

Tab 6.2: Composizione ionica di "acqua artificiale" idonea per l'allevamento di Daphnia magna (Vollenweider, 1964)

Secondo Peters (1987), non esiste una composizione dell'acqua che possa definirsi ottima per l'allevamento di Daphnia; tuttavia, acque ad elevata durezza sembrano essere preferibili (Murphy J., 1970; Lewis M., 1981), così pure povere in potassio che sembra avere effetti negativi sul potenziale riproduttivo. L'acqua così preparata è stata saggiata per verificarne l'idoneità all'allevamento di Daphnia magna. A questo scopo è stato utilizzato un gruppo di almeno dieci organismi, di età inferiore alla 24 ore, mantenuti in 500 ml di acqua ed alle condizioni previste per l'allevamento. Ogni 48 ore sono stati trasferiti, previa rimozione, i daphnidi prodotti in altri 500ml di mezzo fresco, con aggiunta di cibo nelle quantità indicate.

La prova ha una durata di circa 14 giorni, corrispondenti a tre schiuse. Le condizioni d'idoneità dell'acqua di allevamento si hanno se:

- La prima schiusa avviene entro il nono giorno;
- Il numero medio complessivo di neonati per femmina dopo tre schiuse è superiore a 20 e preferibilmente prossimo a 60 se la mortalità non supera il 20%.

Il prolungamento della prova oltre la terza schiusa è comunque consigliabile offrendo maggiori garanzie di idoneità.

6.4.10. ESECUZIONE DEL SAGGIO

Gli organismi usati per il saggio sono daphnidi di età inferiore alle 24 ore. Per ottenere i neonati con questa caratteristica, 24 ore prima dell'esecuzione del test sono state isolate in acqua di diluizione, delle vasche d'allevamento, un numero adeguato di femmine adulte prossime al parto, riconoscibili per il colore aranciato delle uova poste nella camera di incubazione.

Il campione è portato alla temperatura di 20°C.

Per il saggio si predispongono contenitori tali da poter contenere un volume totale di 50 ml:

- I Con 50 ml di acqua di diluizione, il nostro controllo;
- I Con 50 ml di ciascun campione tal quale (100%);

La soluzione così preparata deve essere aerata per 24 ore prima dell'impiego. Si trasferiscono in ciascuno dei recipienti 10 neonati di *Daphnia magna*: questa operazione va condotta in modo da non danneggiare gli animali e a questo scopo si può utilizzare una pipetta di plastica con un diametro di 3-5 mm provvista di bulbo. I trasferimenti sono stati effettuati immergendo la pipetta sotto la superficie e rilasciando lentamente il liquido che contiene gli organismi; il volume d'acqua aspirato deve essere il minimo possibile così da non provocare diluizioni significative del campione in esame. A trasferimento avvenuto si registra l'ora d'inizio della prova.

Durante il saggio gli animali non devono essere alimentati.

6.4.11. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Dopo 24, 48, 72 ore, a seconda del tempo prescelto, si procede alla lettura del test: sono stati contati gli organismi immobili e in pratica incapaci, dopo lieve agitazione, di nuotare per 15 secondi.

Se nel controllo gli organismi immobili superano il 10% il saggio va ripetuto.

Il saggio dovrà essere ripetuto anche quando dopo le 24 ore dalla prova, in presenza di casi di immobilizzazione, la concentrazione dell'ossigeno disciolto risulterà inferiore ai 2 mg/L. In

questo caso il saggio dovrà essere allestito ricambiando le soluzioni in esame durante le 24 ore della prova, oppure equipaggiando i recipienti con sistemi di aerazione che non diano luogo a turbolenza o ad altri inconvenienti dannosi per gli animali.

Con i dati nella prova a 24 ore può essere calcolata l' EC_{50} (in mg/L o in % di diluizione) e i rispettivi limiti fiduciali. La condizione necessaria per questi calcoli è che vi siano almeno due casi di parziale immobilizzazione (diversi, cioè da 0 e 100%) e prossimi, possibilmente, al 50%. Se questa condizione non è raggiunta si può fare ricorso ad altri metodi di calcolo oppure si può ripetere la prova operando in un ambito più idoneo di concentrazione o di diluizione.

Il saggio può essere prolungato per la valutazione dell' EC_{50} a 48 ore (IRSA, 1994)

Vengono proposti tre metodi per il calcolo dell' EC_{50} e dei relativi limiti fiduciali. La corretta applicazione del primo metodo richiede che i risultati del saggio comprendano almeno due effetti parziali, diversi cioè da immobilizzazione 0 e 100%, quantunque esso possa fornire una stima della EC_{50} e dei limiti di confidenza anche con un solo risultato parziale. Il secondo metodo viene utilizzato in assenza di effetti intermedi fra 0 e 100% e quando non siano necessarie particolari informazioni sulla relazione concentrazione/effetto del tossico in esame. È proposto infine un terzo metodo di calcolo, disponibile come programma per personal computer, la cui applicabilità necessita di almeno due risultati parziali.

LITCHFIELD E WILCOXON: Retta concentrazione/effetto

Si tabulano le concentrazioni di sostanza o le percentuali (v/v) di effluente saggate e le corrispondenti percentuali cumulative di organismi immobilizzati ($=100 \times n/20$). Non si considerano più di due concentrazioni consecutive che hanno causato la completa immobilizzazione (100%) e parimenti non più di due che hanno determinato effetto nullo (0%).

Escludendo gli effetti 0 e 100%, si rappresentano su carta logaritmo-probabilistica le percentuali di organismi immobilizzati in funzione delle concentrazioni corrispondenti. Queste ultime sono riportate sulla scala logaritmica e gli effetti sulla scala delle ordinate. Si traccia la retta che meglio approssima i punti ottenuti, privilegiando quelli compresi fra il 40 e il 60% di effetto. Utilizzando la retta si leggono e si tabulano gli effetti attesi per ciascuna delle concentrazioni saggate, scartando quelle il cui effetto atteso risulti inferiore a 0,01 o

superiore a 99,99. Il grafico viene completato rappresentando anche le concentrazioni che hanno prodotto effetto 0 e 100%. A questo scopo si legge sulla retta tracciata l'effetto atteso per tali concentrazioni e si riporta in grafico il corrispondente valore corretto secondo le indicazioni della tabella 6.3.

Atteso	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	0,3	0,7	1,0	1,3	1,6	2,0	2,3	2,6	2,9
10	3,2	3,5	3,8	4,1	4,4	4,7	4,9	5,2	5,5	5,7
20	6,0	6,2	6,5	6,7	7,0	7,2	7,4	7,6	7,8	8,1
30	8,3	8,4	8,6	8,8	9,0	9,2	9,3	9,4	9,6	9,8
40	9,9	10,0	10,1	10,2	10,3	10,3	10,4	10,4	10,4	10,5
50	-	89,5	89,6	89,6	89,6	89,7	89,7	89,8	89,9	90,0
60	90,1	90,2	90,4	90,5	90,7	90,8	91,0	91,2	91,4	91,6
70	91,7	91,9	92,2	92,4	92,6	92,8	93,0	93,3	93,5	93,8
80	94,0	94,3	94,5	94,8	95,1	95,3	95,6	95,9	96,2	96,5
90	96,8	97,1	97,4	97,7	98,0	98,4	98,7	99,0	99,3	99,7

Tab. 6.3: Valori corretti per effetto 0 e 100%

Se la retta ottenuta risulta insoddisfacente si traccia una nuova retta e si ripetono i passaggi descritti.

TEST DEL CHI²

Si calcolano e si tabulano le differenze tra i valori osservati (o corretti) ed i valori attesi. Mediante il nomogramma della figura 6.5, per ciascuna differenza viene determinato e tabulato il corrispondente contributo al Chi². Si sommano poi i singoli contributi e si moltiplica il totale per il numero medio di animali saggiati per concentrazione calcolando a questo scopo, il rapporto fra il numero complessivo di organismi usati per le sole concentrazioni riportate in grafico e il numero delle medesime (=K).

Il dato così ottenuto rappresenta il valore del Chi² della retta in esame. Il numero dei gradi di libertà è dato dal numero di concentrazioni rappresentate in grafico diminuito di due unità (G.L.=K-2). Se il Chi² della retta è inferiore al valore riportato nella tabella 7.3 per n gradi di libertà, significa che la retta tracciata approssima in modo soddisfacente i risultati sperimentali. In caso contrario si traccia una nuova retta che possa approssimare meglio i dati ottenuti e si ripete l'esame descritto.

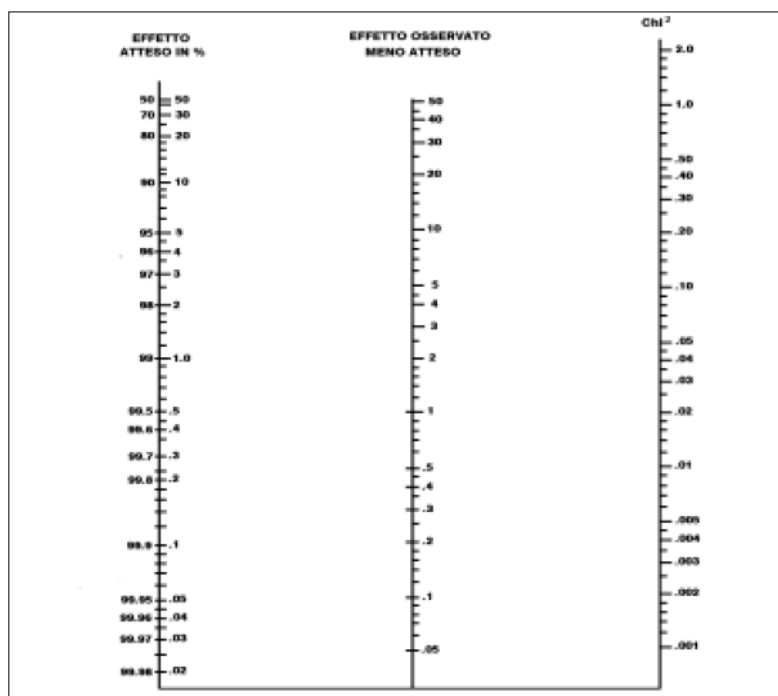


Fig. 6.5: Nomogramma dei contributi al χ^2

Gradi di libertà (G.L.)	χ^2
1	3,84
2	5,99
3	7,82
4	9,49
5	11,1
6	12,6
7	14,1
8	15,5
9	16,9
10	18,8

Tab. 6.4: Valori del χ^2 ($P = 0,05$)

EC₅₀ E LIMITI FIDUCIALI

Il valore della EC₅₀ (24 o 48h) è letto sulla scala logaritmica del grafico della retta in corrispondenza dell'effetto del 50%.

Mediante il grafico della retta si individuano le concentrazioni pari ad un effetto del 16 e dell'84% (EC₁₆, EC₈₄) e si calcola il valore della funzione S secondo la seguente espressione:

$$S = \frac{\left[\left(\frac{EC_{84}}{EC_{50}} \right) + \left(\frac{EC_{50}}{EC_{16}} \right) \right]}{2}$$

Si determina il valore di N che rappresenta il numero complessivo di organismi saggiati alle concentrazioni il cui effetto atteso è compreso fra 16 e 84% e si procede al calcolo del fattore f mediante la seguente espressione:

$$f_{EC_{50}} = S^{\left(\frac{2.77}{\sqrt{N}} \right)}$$

dove S e N hanno il significato già illustrato. I limiti fiduciali della EC₅₀ al 95% di probabilità si ottengono come segue:

limite superiore = EC₅₀ * f_{EC50}

limite inferiore = EC₅₀ / f_{EC50}

6.4.11.1. MEDIA GEOMETRICA

Calcolo della EC₅₀

In assenza di risultati parziali la EC₅₀ può essere calcolata come segue:

$$EC_{50} = \sqrt{(A \cdot B)}$$

dove A è la massima concentrazione che non ha causato immobilizzazione (effetto 0%) e B è la minima che ha determinato la completa immobilizzazione degli organismi saggiati (effetto 100%).

Limiti fiduciali

Le due concentrazioni A e B rappresentano i limiti fiduciali della EC₅₀ con un livello di probabilità che dipende dal numero medio di organismi utilizzato per concentrazione (N). Il livello di probabilità associato ad A e B è calcolato con la seguente espressione:

$$P = 100 \times \left[1 - 2 \left(\frac{1}{2} \right)^N \right]$$

Con 20 organismi per concentrazione, come previsto dalla presente metodologia di saggio, il livello di probabilità associato ai limiti fiduciali A e B è superiore al 99,99%.

6.4.11.2. ANALISI DEI "PROBITS"

Questo terzo metodo è proposto come programma per personal computer con sistema operativo DOS versione 3.0 o successiva.

Partendo dai risultati sperimentali, che devono comprendere due effetti intermedi tra 0 e 100%, il programma fornisce l'EC₅₀ e l'EC₁ con i relativi limiti fiduciali più una serie di informazioni sulla retta di regressione "probit" e sull'analisi statistica effettuata.

6.5. VALUTAZIONE DELLA FITOTOSSICITA' CON LEPIDIUM SATIVUM

I test di germinazione ed allungamento radicale apparentemente sono stati finora sottovalutati, nonostante siano stati impiegati fin dal 1952 (Hunter J., 1952) e già nel 1983 un'intercalibrazione tra sette laboratori, utilizzando 10 diversi tossici, avesse dimostrato che questo metodo produce risultati molto riproducibili (Ratsch H., 1983). Eppure, come per altri organismi, è noto che proprio gli stadi iniziali dello sviluppo sono i più sensibili alle alterazioni ambientali (Wang W., 1990).

Infatti, i semi delle piante possono sopportare periodi lunghi prolungati di essiccamento ma, quando reidratati, vanno incontro a rapidi cambiamenti; in questa fase, diventano altamente sensibili a stress ambientali che possono influenzare i primi stadi di sviluppo.

Poiché possono essere facilmente valutati end-point quali sopravvivenza, germinazione, velocità di crescita alla luce ed al buio negli stadi precoci e modalità di accrescimento in quelli successivi (Walksh W., 1990), l'utilizzo di test di fitotossicità permette di accertare la presenza di sostanze nocive nel mezzo di coltura.

La crescita radicale, in particolare, è stata spesso utilizzata per valutare la tolleranza delle piante ai metalli, ma può essere ugualmente impiegata per testare la tossicità di soluzioni contenenti composti organici o miscele complesse in effluenti, inoltre, mediante la scelta appropriata delle specie, può essere applicato tanto per campioni di acqua dolce che acqua di mare, anche torbidi o colorati (APHA;AWWA;WEF; 1995).

Il test di germinazione ed allungamento radicale permette di valutare l'eventuale tossicità di un campione misurando l'inibizione della germinazione e/o dell'allungamento radicale di

semi germinati in condizioni controllate e confrontati con appositi controlli (in assenza dell'agente interferente).

Per il test sono stati utilizzati i semi di *Lepidium sativum* (Fig 6.5), una pianta erbacea diffusa in Italia, generalmente utilizzata per la determinazione della fitotossicità del compost (Nappi P., 1986).



Fig 6.5: *Lepidium sativum*

6.5.1. MORFOLOGIA

Il seme di *Lepidium sativum* (Fig 6.6) deriva da un ovulo fertilizzato in cui i tegumenti racchiudono un endosperma (strato monocellulare o formato da poche cellule, risultato dalla fusione di un nucleo generativo maschile con i due nuclei polari per formare un tessuto triploide) e l'embrione (formato dalla fertilizzazione dell'oosfera da parte di un nucleo maschile).

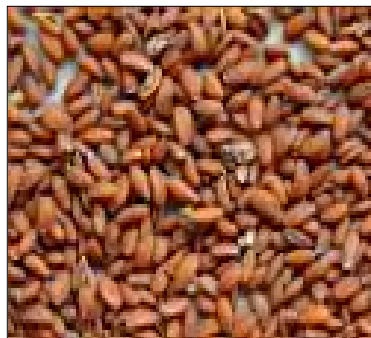


Fig 6.6: semi di *Lepidium sativum*

L'embrione è formato da una corta radice, o radichetta, che si continua in un corto fusto (ipocotile o asse ipocotile) e in un germoglio con uno o più cotiledoni tra i quali c'è una

piccola gemma (piumetta, plumula o gemmala). Il seme è infine completato da tegumenti seminali, con funzione protettiva. Questo non è fotosintetizzante e contiene quindi prodotti di riserva: lipidi e proteine nei cotiledoni ed in parte nell'ipocotile e nella radichetta; carboidrati (come mannani) nelle pareti delle cellule endospermatiche. Sono poi presenti composti citochinine-simili che promuovono l'accrescimento, ed acido abscisico, che invece è un inibitore. La quantità dei prodotti di riserva è molto variabile e, ovviamente, cresce con le dimensioni dei semi.

Durante lo sviluppo, il seme generalmente si disidrata fino a contenere solo il 5-15% in peso d'acqua e l'embrione entra in uno stato di dormienza. Quando viene inumidito, entro due ore completa l'assorbimento di acqua; nelle prime 10 ore aumenta la respirazione, poi inizia la fase di sospensione (tra 10 e 15 ore) perchè i tegumenti limitano il rifornimento di ossigeno, inizia la sintesi di proteine e prendono il via altre reazioni metaboliche, fino alla protrusione della radichetta, determinata dall'espansione cellulare, che può essere o no accompagnata da proliferazione cellulare (mitosi). La respirazione riprende per poi cessare quando i cotiledoni si disintegrano (dopo aver esaurito i materiali di riserva). Allo stesso tempo, una fitasi mobilizza il fosfato dalla fitina associata alle proteine dei cotiledoni; l'ATP viene sintetizzato nelle prime quattro ore (e viene utilizzato per la sintesi proteica), poi la concentrazione si stabilizza fino all'emergenza della radichetta (il contenuto di ATP dei semi imbibiti è direttamente correlato al vigore dei semi, cioè al loro peso, al peso di semi germinati ed alla lunghezza dell'ipocotile).

6.5.2. CONSERVAZIONE DI SEMI

In generale, la buona riuscita del test è funzione delle condizioni di conservazione dei semi; ad esempio, i semi conservati a 18°C, umidità 5-6% ed in atmosfera di biossido di carbonio rimangono vitali più a lungo di semi conservati in contenitori sigillati. D'altra parte, semi completamente imbibiti mantengono una completa terminabilità per almeno 12 mesi.

I prodotti commercialmente disponibili sono costituiti da semi racchiusi in buste sigillate e solitamente garantiscono una terminabilità superiore al 90%.

I semi, conservati al buio e al di sopra di una temperatura minima, rimangono, infatti, dormienti sotto controllo di un inibitore dello sviluppo dell'embrione prodotto dai cotiledoni e dall'endosperma.

La germinazione, soprattutto per semi piccoli, richiede un'esposizione alla luce ed è direttamente controllata dal tipo di illuminazione: luce rosso-arancio (600-700nm) stimola la germinazione, mentre luce blu (420-500 nm), e soprattutto il rosso lontano (720-780 nm) la inibisce.

Questa modulazione è sotto controllo di un pigmento, il citocromo, che può reversibilmente assumere due diverse forme. La conformazione inattiva può lentamente passare a quella attiva anche nell'oscurità, se i semi sono conservati con una sufficiente percentuale di umidità ed a una temperatura <25°C (a temperatura superiore l'embrione non riesce a superare la barriera meccanica dell'endosperma). La luce bianca può però inibire la germinazione a temperature di 28-34°C. Se i semi vengono sottoposti ad un aumento di temperatura, diminuisce la durata minima di illuminazione necessaria per convertire il citocromo nella forma attiva e dare inizio alla germinazione. La risposta è anche più rapida se i semi vengono tenuti a bassa temperatura (<13°C) prima di essere esposti alla luce e/o all'aumento di temperatura, poiché tale trattamento provoca trasformazioni delle membrane cellulari. La germinazione può essere artificialmente indotta al buio somministrando citochinina (forse per la sua azione antagonista dell'acido abscissico, inibitore della sintesi proteica), oppure per esposizione a metabolici di piante e funghi quali la fusicoccina.

6.5.3. LUCE E TEMPERATURA

Il test è stato eseguito alla temperatura di 22°C per 96 ore e al buio al fine di simulare le condizioni in cui si trova il seme nel terreno.

6.5.4. ESECUZIONE DEL SAGGIO

La metodologia messa a punto si compone di due determinazioni: la germinazione e l'accrescimento radicale.

Il saggio è stato eseguito utilizzando il campione testato alle concentrazioni predefinite. Da ciascuna diluizione sono stati prelevati 3mL e posti in una capsula di Petri (90 Ø) contenente un disco di carta bibula. U.S. EPA (1996) raccomanda un test definitivo in cui vengono utilizzate tre repliche con 10 semi ciascuna disposti casualmente all'interno della capsula (Fig. 6.7), fatti precedentemente rigonfiare in acqua distillata per 1 h (Cheung Y., 1989). Infine le

capsule vengono incubate in termostato a 22°C per 96 h. Al termine dell'incubazione, si contano i semi germinati e si misura la lunghezza radicale. Si calcola l'indice di germinazione e la lunghezza delle radici (APHA, AWWA, WEF, 1995).

I tempi di esposizione riportati in bibliografia variano da un minimo di 24 ore (DI.VA.P.R.A. e I.P.L.A., 1992) ad oltre.

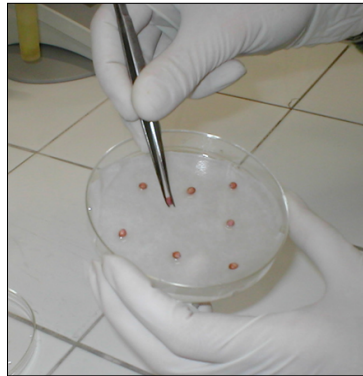


Fig 6.7: Allestimento saggio con *Lepidium sativum*

6.5.5. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Il controllo deve presentare un minimo dell'80% di germinazione (Organization for Economic Cooperation and Development, 1984): per APHA, AWWA, WEF (1995), i semi si considerano germinati quando le radici hanno raggiunto almeno la lunghezza di 5 mm (Fig. 6.8.)



Fig. 6.8: allungamento radicale dopo l'incubazione

Per le concentrazioni considerate è stato calcolato l'indice germinazione mediante la seguente formula:

$$lg \% = \frac{Gc \times Lc}{Gt \times Lt} \times 100$$

Dove:

Gc = n° medio semi germinati nel campione

Gt = n° medio semi germinati nel testimone (o bianco)

Lc = lunghezza radicale media nel campione

Lt = lunghezza radicale media nel testimone (o bianco)

6.6. VALUTAZIONE DELLA TOSSICITA' CRONICA CON PSEUDOKIR-CHNERIELLA SUBCAPITATA

I saggi tossicologici con le alghe verdi costituiscono un valido strumento di indagine per le attività di monitoraggio ambientale e per fornire risposte utili sugli effetti di eventuali inquinanti sulle acque. Lo scopo del saggio è valutare gli effetti tossici degli inquinanti, presenti nella matrice acquosa, sulla crescita di *Pseudokirchneriella subcapitata*. Colture selezionate di tale alga, nella fase esponenziale di crescita, sono esposte a determinate concentrazioni della sostanza o del campione in esame per un periodo di tempo corrispondente a varie generazioni ed in condizioni ben definite. Si determina quindi l'inibizione della crescita rispetto ad una coltura di controllo durante un periodo stabilito. Il saggio può essere utilizzato con tutti i composti chimici solubili in acqua e con tutte quelle sostanze che non interferiscono direttamente con il metodo di misura scelto per la valutazione della crescita algale.

6.6.1. MORFOLOGIA

Le alghe sono organismi unicellulari o pluricellulari di dimensioni variabili prive di apparato radicale. Sono autotrofe grazie alla presenza di clorofilla e sono presenti in tutti gli ecosistemi acquatici. Mediante il processo fotosintetico producono ossigeno indispensabile per la vita della specie animali e contribuiscono all'attività autodepurativa dei corsi d'acqua dolce e marina. In un corso d'acqua, elevate concentrazioni di sostanze nutrienti, quali ad esempio, i composti dell'azoto e del fosforo, in condizioni climatiche miti, possono provocare crescite abnormi di vegetazioni e di alghe con modificazioni degli ambienti

acquatici e delle concentrazioni di ossigeno disciolto, con la conseguente comparsa di sostanze tossiche per le specie animali presenti. Tale fenomeno, noto come eutrofizzazione, può compromettere l'uso dei corpi idrici a scopi idropotabili, per l'itticoltura, molluscoltura e per la balneazione. La crescita delle popolazioni algali monocellulari è, di norma, esponenziale e perché rimanga tale, è necessario mantenere sotto costante controllo la temperatura, l'illuminazione e la disponibilità di nutrienti. L'alga unicellulare d'acqua dolce utilizzata per l'esecuzione del test è *Pseudokirchneriella subcapitata* (Fig 6.9) – ceppo ATCC (American Type Culture Collection). Le cellule hanno un volume di $40\text{-}60\ \mu\text{m}^3$, dimensioni di $6\text{-}7\ \mu\text{m}$, si presentano immobile per tutto il ciclo vitale, che dura 7 giorni, ed hanno una caratteristica forma a falce.



Fig 6.9: *Pseudokirchneriella subcapitata*

6.6.2. STRUMENTAZIONE

Oltre alla normale strumentazione di laboratorio, sono necessari:

- l Un sistema di illuminazione che consenta di ottenere circa 4300 lux a livello del piano di lavoro;
- l Lampade fluorescenti del tipo "cool-white" con indice di resa $\bullet 90$ fornito di temporizzatore per il controllo del fotoperiodo;
- l Un sistema di termoregolazione atto al mantenimento della temperatura nell'ambito di $24 \pm 1^\circ \text{C}$;
- l Un sistema di aerazione a bassa portata e pressione e fornito di diffusori;
- Beute di vetro borosilicato Pyrex con una capacità di 500 mL.

6.5.3. TERRENO PER LA COLTURA ALGALE

Il terreno di coltura per l'ottenimento della sospensione algale che si utilizza come inoculo

nell'esecuzione del saggio, è stato allestito a partire dalle seguenti 5 soluzioni saline acquose, sterilizzate mediante filtrazione su membrana 0.45 µm e conservate alla temperatura di 4° C:

- NaNO_3 : 60375 g/L
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 14.700 mg/L
- K_2HPO_4 : 1.044 g/L
- NaHCO_3 15.000 g/L
- Soluzione dei seguenti micronutrienti:

NaNO_3	25.500 g/L
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	12.164 g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.410 g/L
H_3BO_3	185.520 mg/L
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	415.380 mg/L
ZnCl_2	3.270 mg/L
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.428 mg/L
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.012 mg/L
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7.260 mg/L
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	160.000 mg/L
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	300.000 mg/L

Il terreno di coltura è stato preparato aggiungendo, in condizioni asettiche, 1 mL di ciascuna delle cinque soluzioni in 1L di acqua deionizzata sterile. Il pH è stato infine aggiustato a 7.5 ± 1 .

6.6.4. TERMOREGOLAZIONE

La temperatura per il mantenimento di *Pseudokirchneriella subcapitata* è di $24 \pm 1^\circ \text{C}$.

6.6.5. ILLUMINAZIONE

Le beute delle colture algali sono state mantenute con una illuminazione di 4300 lux, ricavata con lampade fluorescenti del tipo "cool-white" con indice di resa cromatica •90 e con un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 di buio.

6.6.6. OSSIGENAZIONE E AGITAZIONE

Le beute delle colture algali sono state ossigenate insufflando aria mediante un sistema di aerazione fornito di diffusori. Quest'aria può contenere contaminanti che vanno rimossi per passaggio su cartuccia di carbone attivo o altro materiale adsorbente. Inoltre la coltura è stata sottoposta ad oscillazione continua a 100rpm mediante un piano rotante.

6.6.7. PREPARAZIONE DELLA SOSPENSIONE ALGALE E MANTENIMENTO DEL CLONE ALGALE

E' stata allestita una coltura in terreno algale liquido dal ceppo conservato generalmente su terreno solido, trasferendo, con ansa sterile, parte della platina algale. Se il clone di partenza è conservato in terreno liquido, si trasferisce un'aliquota opportuna, da calcolare mediante conteggio algale tale da raggiungere una densità iniziale di 200.000 cellule/mL. Dopo 5-6 giorni d'incubazione la coltura è in fase di crescita esponenziale e la biomassa raggiunge in genere una densità prossima ai 9-10 milioni di cellule/mL. La biomassa algale è stata quindi separata dal resto del mezzo di coltura mediante due successive centrifugazioni (1500 – 2000 rpm per 5-10 minuti). Le cellule, risospese nello stesso tipo di acqua usata per i lavaggi in modo da ottenere una densità d'impiego di circa 100 milioni di cellule /mL, sono conservabili al buio alla temperatura di 4°C. In tali condizioni le cellule si conservano vitali per 30 giorni e potranno essere utilizzare per inoculare la coltura successiva.

6.6.8. PROCEDURA DEL SAGGIO

6.6.8.1. PREPARAZIONE DELL'INOCULO ALGALE

Il saggio prevede l'aggiunta in ogni beuta di una quantità standardizzata di sospensione algale a concentrazione nota e costante detta inoculo. Questo viene preparato a partire dalla coltura di mantenimento dove le alghe si trovano in fase di crescita esponenziale; a tal fine un'aliquota di sospensione algale di circa una settimana di età è stata prelevata, lavata con acqua di durezza 30-50 mg CaCO₃/L per evitare di trascinare nelle beute del saggio una quantità minima di terreno, e mantenuta 24 ore in incubazione nel liquido di lavaggio nelle stesse condizioni ambientali della coltura di mantenimento.

Successivamente la sospensione è stata sottoposta a conteggio cellulare mediante conta particelle elettronico o camera di Burkner e diluita opportunamente in modo tale da ottenere una densità di 300×10^3 cellule/mL. Questa operazione va condotta avendo cura di prelevare

sempre lo stesso volume della sospensione mantenuta omogenea mediante periodica agitazione.

6.6.8.2. ESECUZIONE DEL TEST

Si inizia con i test preliminari per individuare l'intervallo di concentrazione entro il quale il campione in esame può determinare effetti tossici. In base ai risultati ottenuti si scelgono per il test definitivo le soluzioni a concentrazione più bassa, che non dovrebbe provocare alcun effetto sull'accrescimento algale, mentre la più alta dovrebbe inibire l'accrescimento di almeno il 50% rispetto al controllo o, al meglio, arrestarlo completamente. Sono state utilizzate per il test beute della capacità di 100 mL che conterranno la soluzione a concentrazione nota della sostanza o del campione da analizzare (Fig 6.10). Tutte le diluizioni sono state eseguite con il terreno di coltura fino ad un volume di 100 mL. In ogni beuta è stata aggiunta un'aliquota dell'inoculo preparato come prima descritto così da ottenere una concentrazione iniziale di 10^5 cellule/mL. Il test è stato condotto in una stanza termostata a $20 \pm 1^\circ \text{C}$ e incubando la coltura algale con un'illuminazione di circa 4000 lux e in agitazione continua. Sia per la coltura algale contenente la sostanza in esame che per il controllo, sono state allestite tre repliche. Il pH è stato misurato all'inizio ed al termine del test e non dovrebbe variare oltre un'unità per tutta la durata del test. Al termine del saggio si deve determinare l'ossigeno disciolto che non dovrebbe essere inferiore a 2 mg/L.



Fig.6.10: saggio con *Pseudokirchneriella subcapitata*

Dopo un intervallo d'incubazione di 96 ore si procede alla determinazione della concentrazione algale in ogni beuta del saggio mediante la conta delle cellule. Con i dati

raccolti dopo 96 ore di incubazione, può essere determinato il range di concentrazione che comprende la no-observed-effect-concentration (NOEC), ovvero la concentrazione massima di non effetto e la più bassa concentrazione che inibisce completamente la crescita algale.

6.6.9. CONTEGGIO CELLULARE MEDIANTE LA CAMERA DI BURKER

Il numero di cellule algali è stato determinato mediante conteggio al microscopio. Viene utilizzata per questo scopo la Camera di Burker (Fig 6.11) che è costituita da un reticolo contenente 9 quadrati grandi, ognuna dei quali ha una superficie di 1 mm e che a loro volta sono suddivisi in 16 quadrati piccoli con una superficie unitaria di $1/25$ mm (Fig 6.12).



Fig. 6.11: Camera di Burker

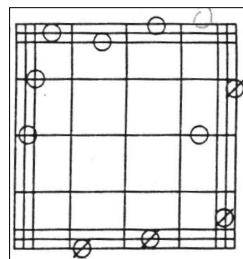


Fig. 6.12: Quadrato piccolo della camera di Burker

Per il conteggio, si poggia una goccia di sospensione algale tra la camera ed il vetrino coprioggetto e si conta il numero di cellule presenti in un quadrato grande. Tale numero moltiplicato per 10 ci dà il valore della densità algale espressa come numero di cellule x 10/mL.

6.6.10. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

In seguito alle 72 ore di incubazione sono state misurate le densità cellulari in ogni replica di ogni concentrazione del campione ed in ogni replica della soluzione di controllo. La prova

deve essere considerata non valida se in seguito alle 72 ore la densità cellulare iniziale della soluzione di controllo (pari a 10×10^3 cell/mL) non sia aumentata di almeno 16 unità, se il Coefficiente di Variazione delle densità cellulari delle repliche della soluzione di controllo non sia inferiore al 20% e se il pH abbia subito una variazione superiore a 1.5 durante la prova. Il confronto statistico tra le repliche di ciascuna diluizione del campione e del bianco, è stato eseguito allo scopo di valutare se il campione abbia esercitato un effetto significativo sulla crescita algale rispetto alla soluzione di controllo e per calcolare la NOEC. Il confronto statistico può essere eseguito mediante la statistica parametrica (Test di Dunnett o Test di Student) oppure, in alternativa, mediante la statistica non parametrica (Test di Steel o Test di Wilcoxon-Mann-Whitney). I test parametrici sono utilizzati a condizione che le popolazioni dei dati risultino distribuite normalmente (da verificare con il test del χ^2 oppure con il test di Shapiro-Wilk) e che le varianze dei gruppi risultino omogenee (da verificare con il test di Bartlett). Nel caso che uno soltanto dei due requisiti non risultasse verificato, è necessario scartare la statistica parametrica e procedere con la statistica non parametrica. Il test di Student, è utilizzato per confrontare i risultati ottenuti con la sola aliquota di campione non diluito (100%) ed il controllo. Il test di Dunnett, è utilizzato per confrontare i risultati ottenuti con tutte le aliquote di campione utilizzate ed il controllo. Il test di Dunnett consente, inoltre, di calcolare la NOEC.

6.6.10.1. DETERMINAZIONE DELLA EC_{50}

Utilizzando i valori medi delle densità algali rilevate nelle aliquote contenenti il campione, è stata calcolata la percentuale dell'inibizione della crescita rispetto al controllo. E' stata utilizzata, a tal fine, la seguente formula:

$$INIBIZIONE\% = DcC - DcCa / DcC$$

DcC: Densità cellulare del controllo

DcCa: Densità cellulare del campione

I valori delle densità sono espressi come numero di cellule $\times 10^3$ /mL. Riportare su carta semilogaritmica o logaritma-probit i valori delle inibizioni percentuali rispetto al controllo e i rispettivi valori di concentrazione delle aliquote diluite (con le concentrazioni delle aliquote riportate nella scala logaritmica), tracciare ad occhio la retta che meglio si adatta ai punti

riportati sul grafico e leggere il valore della EC_{50} . In alternativa è possibile calcolare i valori della EC_{50} per mezzo di un sistema di calcolo informatico.

7. RISULTATI E DISCUSSIONE

7.1. RISULTATI DEI SAGGI DI TOSSICITÀ ACUTA CON DAPHNIA MAGNA

I dati ottenuti dai saggi di tossicità acuta con *Daphnia magna* per i nove farmaci presi in esame sono riportati di seguito.

DICLOFENAC				
Concentrazione mg/L	% organismi immobili 24 h	% organismi immobili 48 h	Dev.standard	
5	0	0	0	0
10	0	0	0	0
20	0	0	0	0
40	0	0	0	0
80	30	40	0,58	0,82
160	100	100	0	0
320	100	100	0	0

Tabella 7.1: Risultati saggio acuto con *Daphnia magna* su Diclofenac

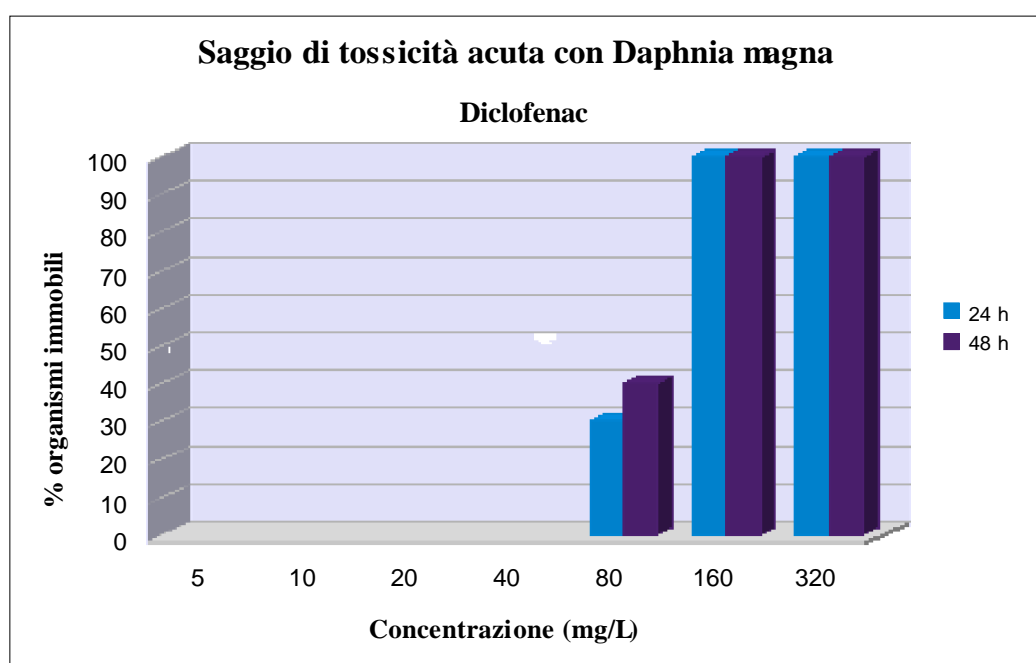


Grafico 7.1: Risultati saggio acuto con *Daphnia magna* su Diclofenac

Il grafico 7.1 mette a confronto gli effetti del farmaco Diclofenac (a diverse concentrazioni) a 24 e 48 ore sul bioindicatore *Daphnia magna*.

Come si evince dal grafico, il farmaco testato registra un effetto tossico a carico di *D.magna* maggiore a 48 ore di esposizione ad una concentrazione pari a 80mg/L, ma causa la stessa percentuale di organismi immobili a partire da 160mg/L.

IBUPROFEN				
Concentrazione mg/L	% organismi immobili 24 h	% organismi immobili 48 h	Dev.standard	
0,31	10	15	0,58	0,5
0,06	20	30	0,82	0,58
0,13	35	40	0,96	0,82
0,25	50	65	0,58	0,5
0,5	65	75	0,5	0,5
1	70	80	1,29	0,82
5	100	100	0	0
10	100	100	0	0
20	100	100	0	0
40	100	100	0	0
80	100	100	0	0
160	100	100	0	0
320	100	100	0	0

Tabella 7.2: Risultati saggio acuto con *Daphnia magna* su Ibuprofen

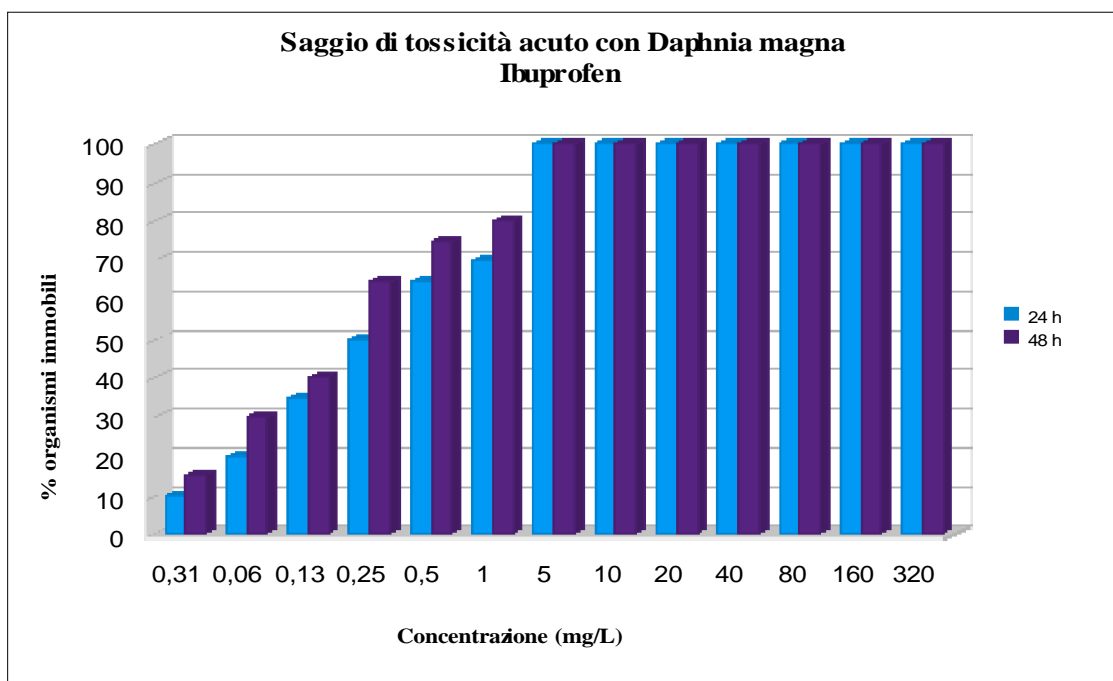


Grafico 7.2: Risultati saggio acuto con *Daphnia magna* su Ibuprofen

Il grafico 7.2 mette a confronto gli effetti del farmaco Ibuprofen (a diverse concentrazioni) a 24 e 48 ore sul bioindicatore *Daphnia magna*.

Come si può evincere dal grafico, il farmaco testato causa una percentuale di inibizione della mobilità superiore a 48 ore di esposizione fino ad una concentrazione pari ad 1mg/L, mentre, a partire da 5mg/l, registra lo stesso effetto tossico a carico di *D.magna*.

AMOXICILLIN				
Concentrazione mg/L	% organismi immobili 24 h	% organismi immobili 48 h	Dev.standard	
1,25	10	10	0,58	0,58
2,5	20	40	0,82	0,82
5	70	90	0,58	0,58
10	100	100	0	0
20	100	100	0	0
40	100	100	0	0
80	100	100	0	0
160	100	100	0	0
320	100	100	0	0

Tabella 7.3: Risultati saggio acuto con *Daphnia magna* su Amoxicillin

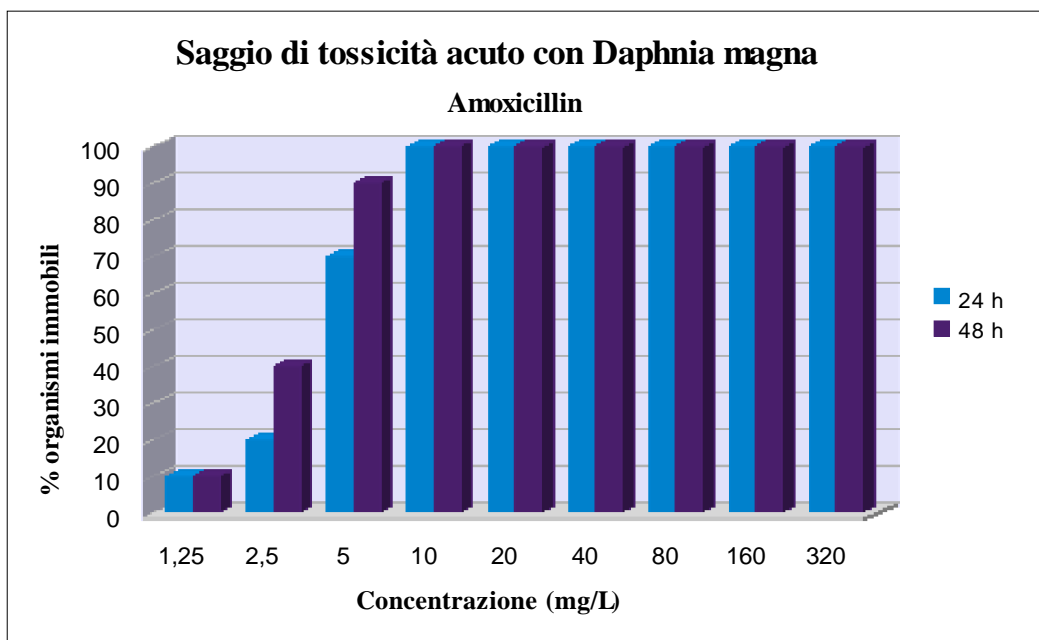


Grafico 7.3: Risultati saggio acuto con *Daphnia magna* su Amoxicillin

Il grafico 7.3 mette a confronto gli effetti del farmaco Amoxicillin (a diverse concentrazioni) a 24 e 48 ore sul bioindicatore *Daphnia magna*.

Dal grafico si deduce che Amoxicillin causa una percentuale di organismi immobili pressoché simile a 24 e 48 ore di esposizione, infatti, come mostrato nel grafico, registra lo stesso effetto a carico di *D.magna* ad una concentrazione pari a 1.25mg/L e a partire da 10mg/L.

OFLOXACIN				
Concentrazione mg/L	% organismi immobili 24 h	% organismi immobili 48 h	Dev.standard	
5	0	0	0	0
10	0	0	0	0
20	0	0	0	0
40	20	30	1,15	0,58
80	40	55	1,41	1,89
160	70	80	0,58	0,82
320	100	100	0	0

Tabella 7.4: Risultati saggio acuto con *Daphnia magna* su Ofloxacin

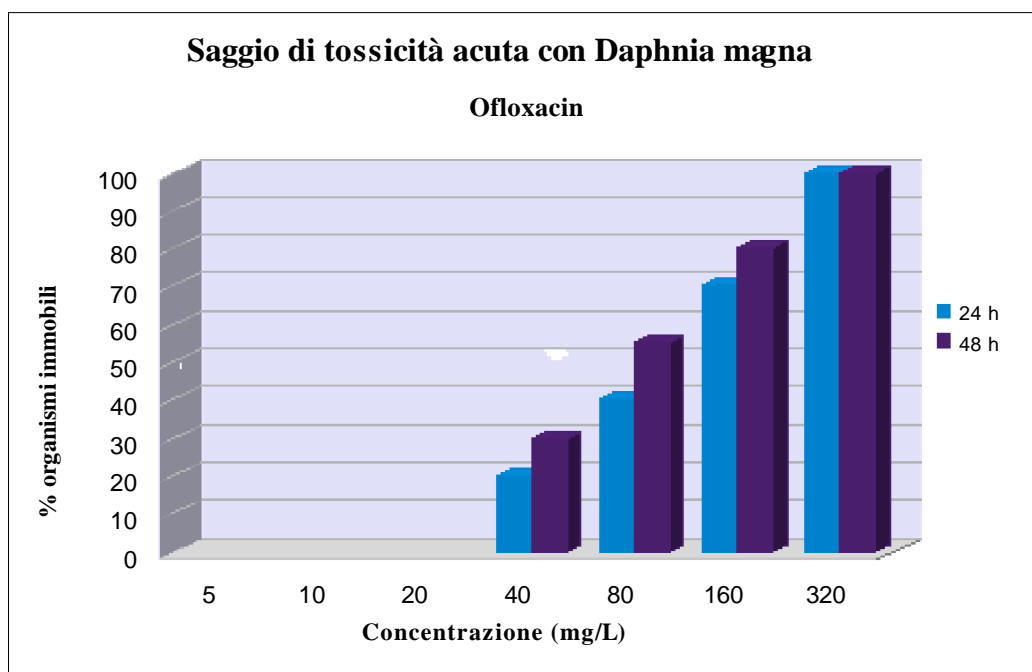


Grafico 7.4: Risultati saggio acuto con *Daphnia magna* su Ofloxacin

Il grafico 7.4 mette a confronto gli effetti del farmaco Ofloxacin (a diverse concentrazioni) a 24 e 48 ore sul bioindicatore *Daphnia magna*.

Dal grafico si evince un maggiore effetto tossico a carico di D.magna a 48 ore di esposizione, infatti, ad esempio, il farmaco testato causa una percentuale di immobilità a partire da 20mg/L, concentrazione che non causa alcun effetto a 24 ore di esposizione.

ERYTHROMYCIN				
Concentrazione mg/L	% organismi immobili 24 h	% organismi immobili 48 h	Dev.standard	
5	0	15	0	0,5
10	0	20	0	0,82
20	5	25	0,5	0,96
40	10	30	0,58	0,58
80	15	35	0,96	0,96
160	50	75	1,29	0,82
320	80	100	0,82	0

Tabella 7.5: Risultati saggio acuto con Daphnia magna su Erythromycin

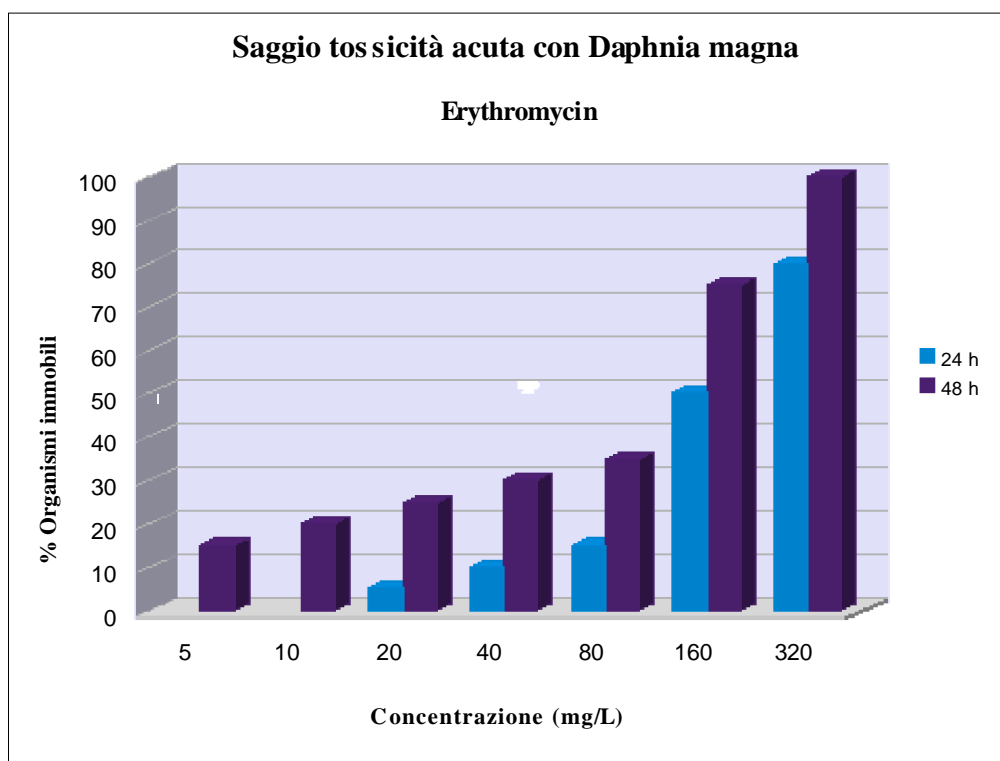


Grafico 7.5: Risultati saggio acuto con Daphnia magna su Erythromycin

Il grafico 7.5 mette a confronto gli effetti del farmaco Erythromycin (a diverse concentrazioni) a 24 e 48 ore sul bioindicatore Daphnia magna.

Come mostrato dal grafico, si riscontra che il farmaco Erythromycin registra un effetto tossico a carico di D.magna a 24 ore di esposizione a partire da una concentrazione pari a

20mg/L, mentre a 48 ore già a partire da una concentrazione di 5mg/L. Da evidenziare nel grafico che Diclofenac causa una maggiore percentuale di inibizione della mobilità a 48 ore di esposizione a parità di concentrazione.

SULFAMETHOXAZOLE				
Concentrazione mg/L	% organismi immobili 24 h	% organismi immobili 48 h	Dev.standard	
1	5	10	0,5	0,58
2,5	25	30	0,5	0,58
5	35	50	0,5	2,89
10	40	75	0,82	0,5
20	75	95	0,5	0,5
40	90	100	0,58	0
80	100	100	0	0
160	100	100	0	0
320	100	100	0	0

Tabella 7.6: Risultati saggio acuto con *Daphnia magna* su Sulfamethoxazole

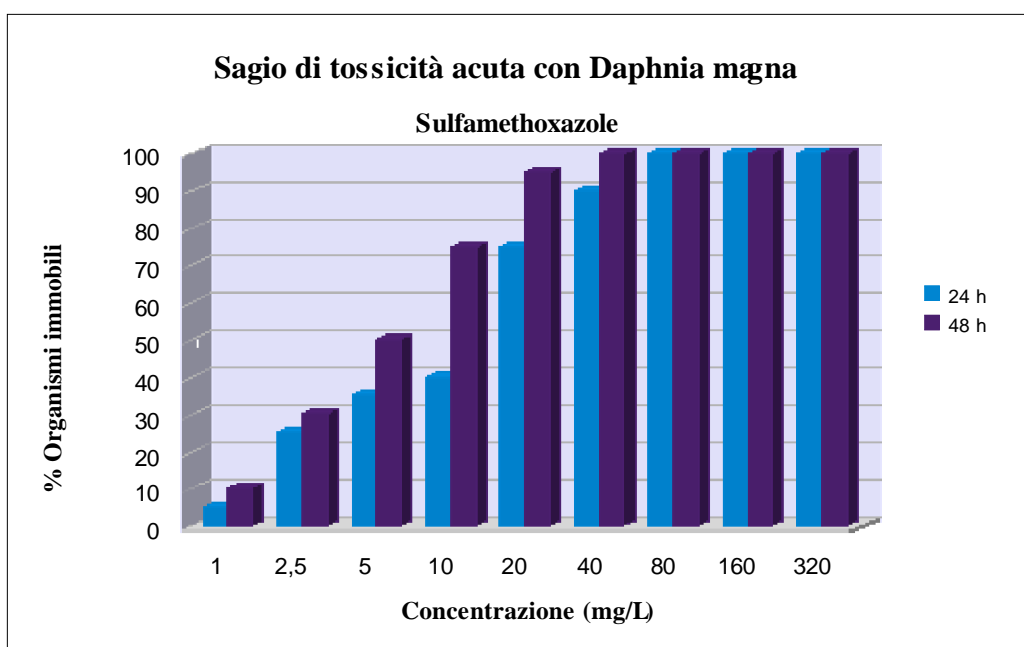


Grafico 7.6: Risultati saggio acuto con *Daphnia magna* su Sulfamethoxazole

Il grafico 7.6 mette a confronto gli effetti del farmaco Sulfamethoxazole (a diverse concentrazioni) a 24 e 48 ore sul bioindicatore *Daphnia magna*.

Il grafico evidenzia che il farmaco Sulfamethoxazole, a 48 ore di esposizione, registra un

effetto tossico maggiore a parità di concentrazione a carico di D.magna.

ATENOLOL				
Concentrazione mg/L	% organismi immobili 24 h	% organismi immobili 48 h	Dev.standard	
1	5	10	0,5	0,58
2,5	15	25	0,5	0,96
5	20	30	0	1
10	25	45	1,26	0,5
20	30	50	0,58	1
40	35	70	0,5	1,29
80	40	80	0,82	1,15
160	55	90	0,5	1
320	65	95	0,5	0,5

Tabella 7.7: Risultati saggio acuto con Daphnia magna su Atenolol

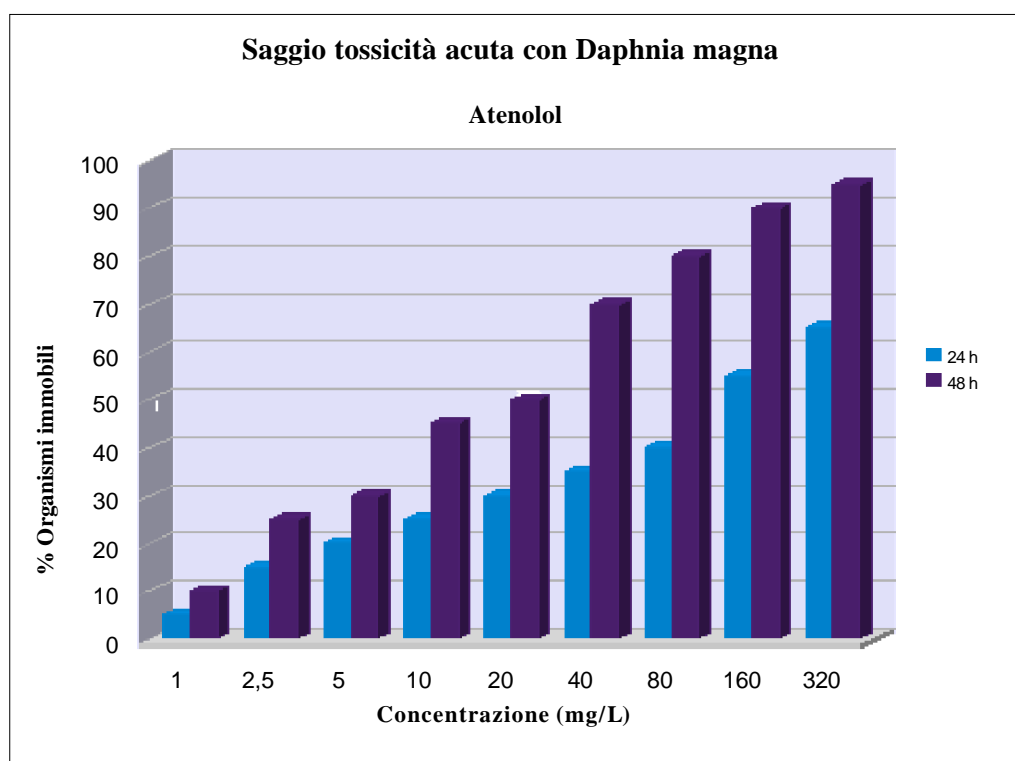


Grafico 7.7: Risultati saggio acuto con Daphnia magna su Atenolol

Il grafico 7.7 mette a confronto gli effetti del farmaco Atenolol (a diverse concentrazioni) a 24 e 48 ore sul bioindicatore Daphnia magna.

Come si osserva dal grafico, il farmaco testato causa sempre una percentuale di organismi

immobili maggiore a 48 ore di esposizione, fin dalle concentrazioni più basse.

PROPRANOLOL				
Concentrazione mg/L	% organismi immobili 24 h	% organismi immobili 48 h	Dev.standard	
0,13	5	15	0,5	0,5
0,25	25	35	0,5	0,5
0,5	30	40	0,58	0,82
1	50	55	0,58	0,5
2	70	75	0,58	0,5
3	80	90	0	0,58
4	85	95	0,96	0,5
5	95	100	0,5	0
10	100	100	0	0
20	100	100	0	0
40	100	100	0	0
80	100	100	0	0
160	100	100	0	0
320	100	100	0	0

Tabella 7.8: Risultati saggio acuto con *Daphnia magna* su Propranolol

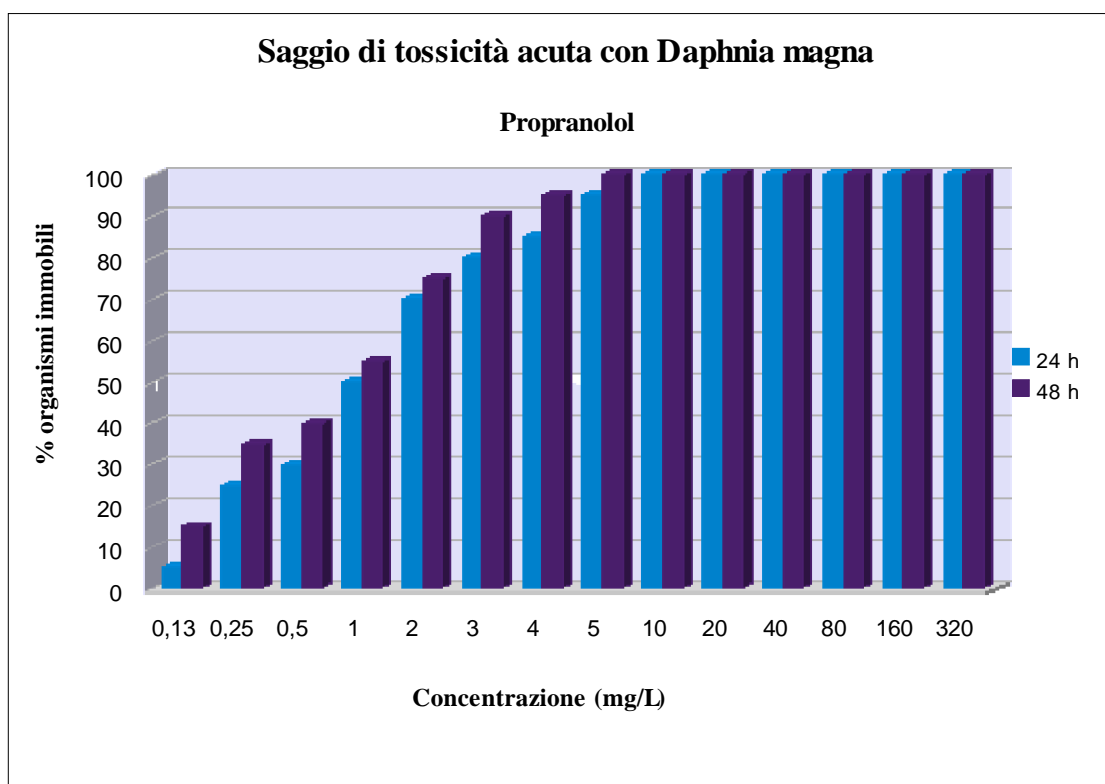


Grafico 7.8: Risultati saggio acuto con *Daphnia magna* su Propranolol

Il grafico 7.8 mette a confronto gli effetti del farmaco Propranolol (a diverse concentrazioni) a 24 e 48 ore sul bioindicatore *Daphnia magna*.

Come mostrato dal grafico, il farmaco Propranolol causa una percentuale di inibizione della mobilità a 48 ore di esposizione superiore rispetto a quella registrata a 24 ore, anche se si evince lo stesso numero di organismi immobili espresso in percentuale a partire da una concentrazione pari a 10mg/L.

CARBAMAZEPINE				
Concentrazione mg/L	% organismi immobili 24 h	% organismi immobili 48 h	Dev.standard	
0,5	5	5	0,5	0,5
1	15	15	0,5	0,5
5	25	50	0,5	0,58
10	40	65	0,82	0,5
20	65	75	0,5	0,5
40	70	85	0,58	0,5
80	85	100	0,96	0
160	100	100	0	0
320	100	100	0	0

Tabella 7.9: Risultati saggio acuto con Daphnia magna su Carbamazepine

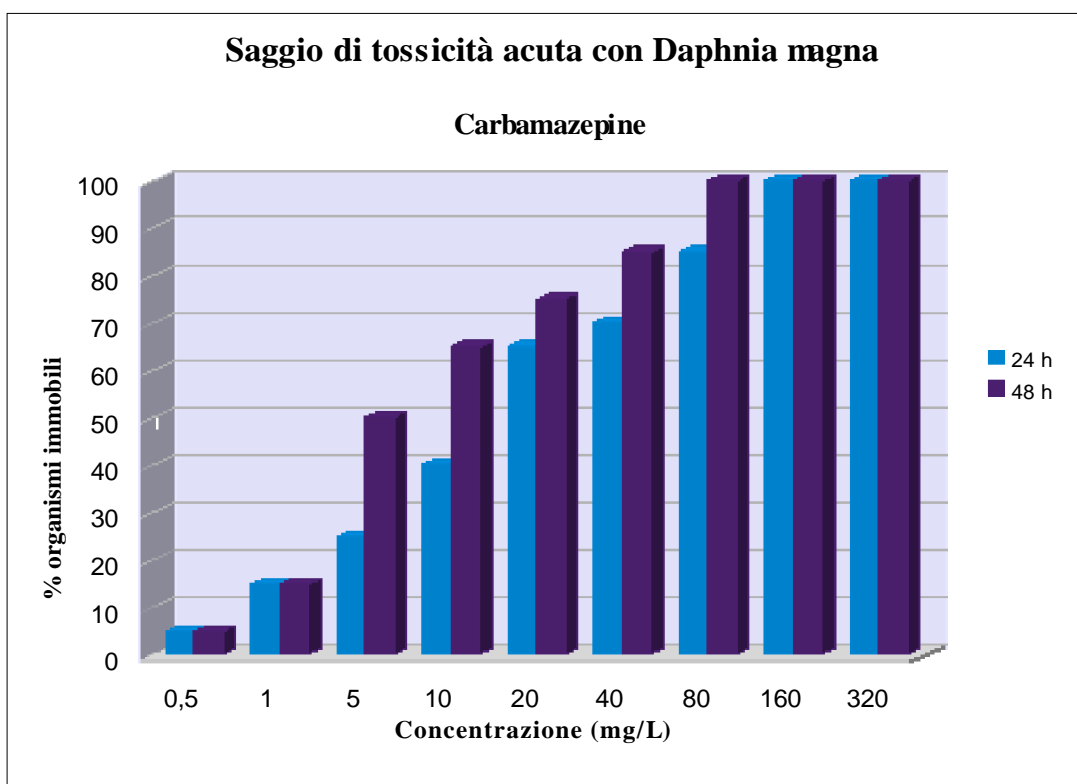


Grafico 7.9: Risultati saggio acuto con Daphnia magna su Carbamazepine

Il grafico 7.9 mette a confronto gli effetti del farmaco Carbamazepine (a diverse

concentrazioni) a 24 e 48 ore sul bioindicatore Daphnia magna.

Dal grafico si evince che il prodotto farmaceutico Carbamazepine risulta avere un effetto tossico a carico di D.magna maggiore a 48 ore di esposizione a partire da una concentrazione pari a 5mg/L, mentre causa la stessa percentuale di organismi immobili a concentrazioni più basse.

7.2. RISULTATI DEI TEST DI TOSSICITA' MEDIANTE I BIOINDICATORI DAPHNIA MAGNA, PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA E LEPIDIUM SATIVUM

I dati ottenuti dai saggi di tossicità con D.magna, P.subcapiata e L.sativum per i nove farmaci in esame sono riportati di seguito.

DICLOFENAC						
Conc mg/L	% org. Imm. 24h	% inib. Cresc. algale	I.G. %	Dev.standard		
5	0	21,29	78,16	0	0,47	0,67
10	0	29,33	69,31	0	1,37	0,13
20	0	38,57	62,37	0	1,18	1,58
40	0	52,12	47,89	0	0,53	1,18
80	30	71,64	28,71	0,58	0,29	1,77
160	100	87,16	12,85	0	0,43	1,17
320	100	88,39	10,92	0	0,62	0,93

Tabella 7.10: Risultati dei test di tossicità su Diclofenac

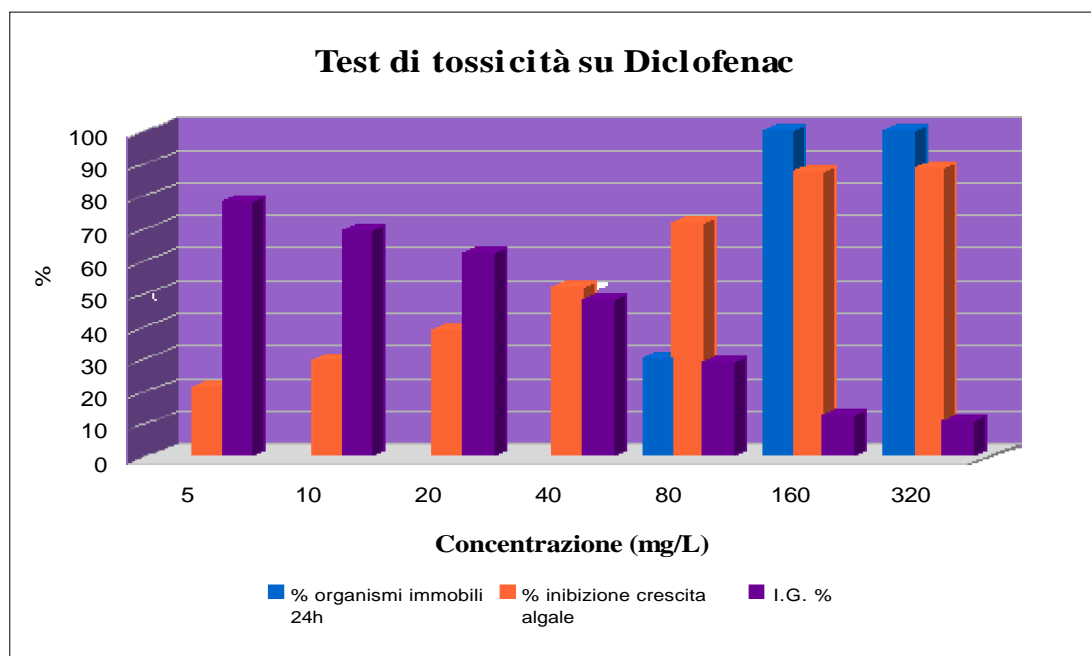


Grafico 7.10: Risultati dei test di tossicità su Diclofenac

Il grafico 7.10 mette a confronto, per lo stesso farmaco testato (a diverse concentrazioni), la risposta dei tre diversi bioindicatori, quali *D.magna*, *P.subcapiata* e *L.sativum*.

Dal confronto tra i tre bioindicatori si evince che *Pseudokirchneriella subcapiata* è risultata il bioindicatore più sensibile, infatti si è registrato un effetto a carico dell'alga fin dalle concentrazioni più basse.

IBUPROFEN						
Conc mg/L	% org. imm. 24h	% inib. cresc. algale	I.G. %	Dev.standard		
5	100	44,32	86,72	0	14,99	0,24
10	100	53,47	78,93	0	9,22	0,99
20	100	64,01	76,59	0	2	0,89
40	100	75,94	32,6	0	1,51	0,79
80	100	79,85	31,18	0	1,9	0,68
160	100	89,91	16,22	0	1,32	1,15
320	100	95,68	4,58	0	0,27	1,58

Tabella 7.11: Risultati dei test di tossicità su Ibuprofen

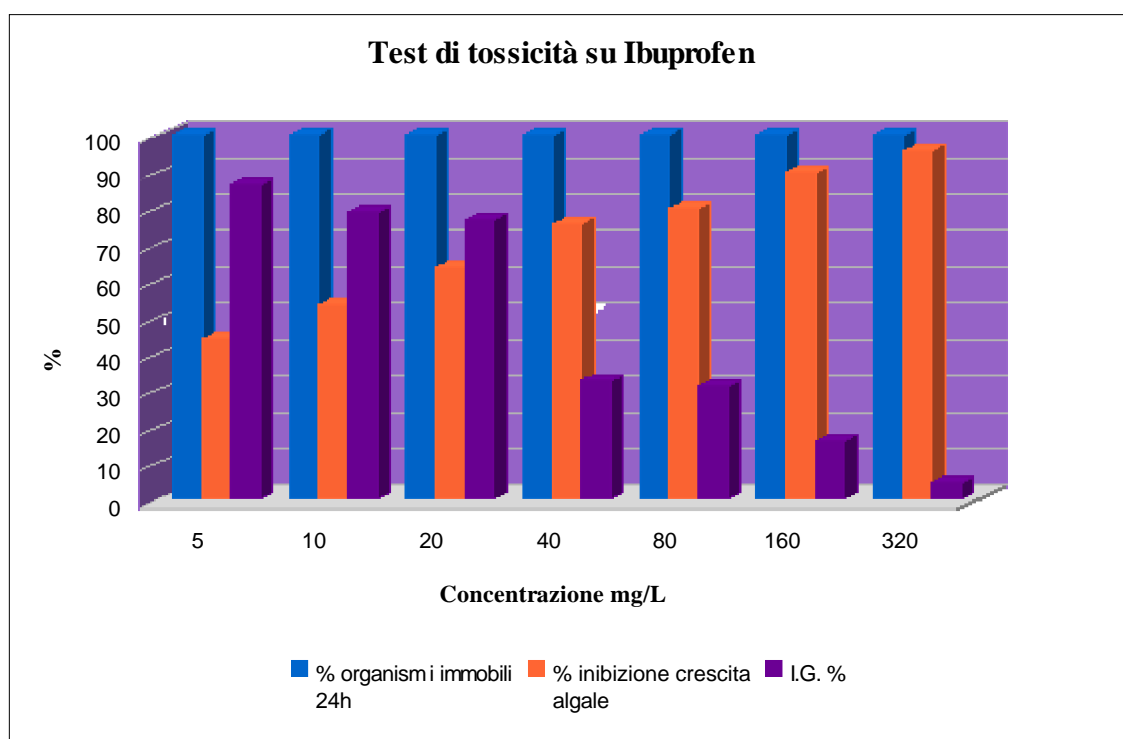


Grafico 7.11: Risultati dei test di tossicità su Ibuprofen

Il grafico 7.11 mette a confronto, per lo stesso farmaco testato (a diverse concentrazioni), la

riposta dei tre diversi bioindicatori, quali *D.magna*, *P.subcapiata* e *L.sativum*.

Dal suddetto grafico si evince che *Daphna magna* rappresenta il bioindicatore maggiormente sensibile, mostrando una tossicità molto alta fin dalle concentrazioni più basse; infatti si registra un 100% di organismi immobili a partire da una concentrazione di 5mg/L.

AMOXICILLIN						
Conc mg/L	% org. imm. 24H	% inib. cresc. algale	I.G. %	Dev.standard		
5	70	89,75	62,81	0,58	1,58	2,76
10	100	90,82	53,02	0	1,9	0,94
20	100	94,91	45,68	0	2,55	1,22
40	100	97,56	34,26	0	1,09	0,78
80	100	97,24	25,29	0	0,96	1,2
160	100	97,99	19,58	0	0,56	1,1
320	100	98,72	12,24	0	0,82	0,94

Tabella 7.12: Risultati dei test di tossicità su Amoxicillin

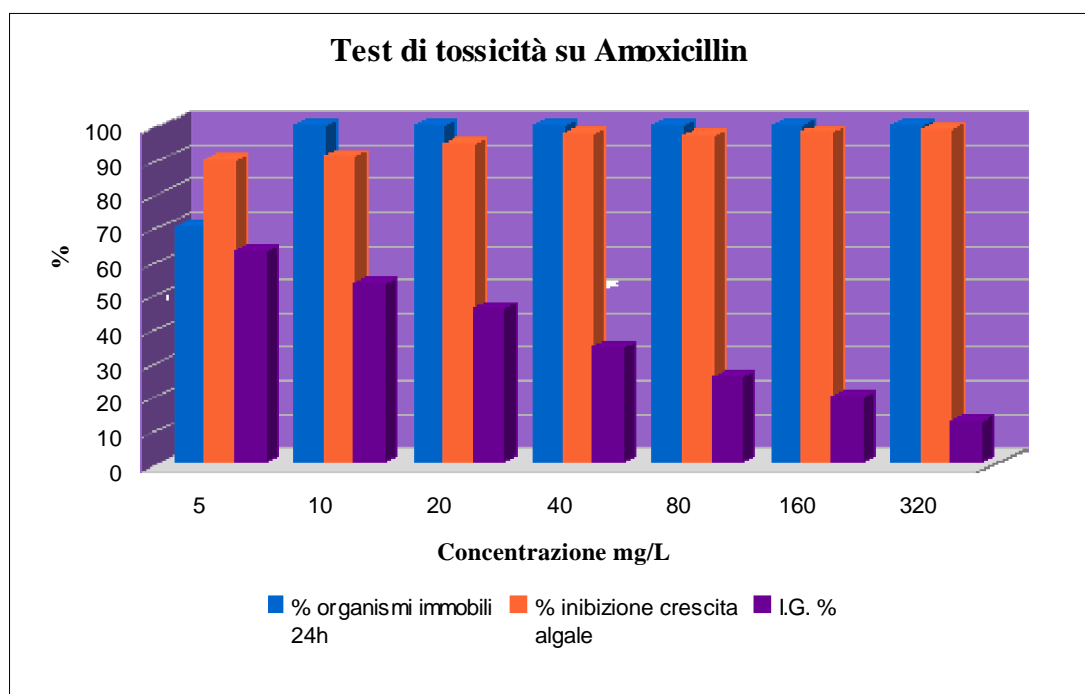


Grafico 7.12: Risultati dei test di tossicità su Amoxicillin

Il grafico 7.12 mette a confronto, per lo stesso farmaco testato (a diverse concentrazioni), la risposta dei tre diversi bioindicatori, quali *D.magna*, *P.subcapiata* e *L.sativum*. Nel grafico si riscontra una simile risposta da parte di *Daphnia magna* e *Pseudokirchneriella subcapitata*,

infatti, entrambi i bioindicatori hanno subito un effetto tossico molto elevato fin dalle concentrazioni più basse.

OFLOXACIN						
Conc mg/L	% org. imm. 24h	% inib. cresc. algale	I.G. %	Dev.standard		
5	0	50,52	49,12	0	3,91	1,72
10	0	55,78	45,89	0	2	0,26
20	0	56,15	43,97	0	0,59	1
40	20	60,03	40,72	1,15	0,68	1,17
80	40	69,39	30,26	1,41	0,78	0,87
160	70	70,21	29,67	0,58	0,8	1,45
320	100	78,37	20,96	0	0,56	0,38

Tabella 7.13: Risultati dei test di tossicità su Ofloxacin

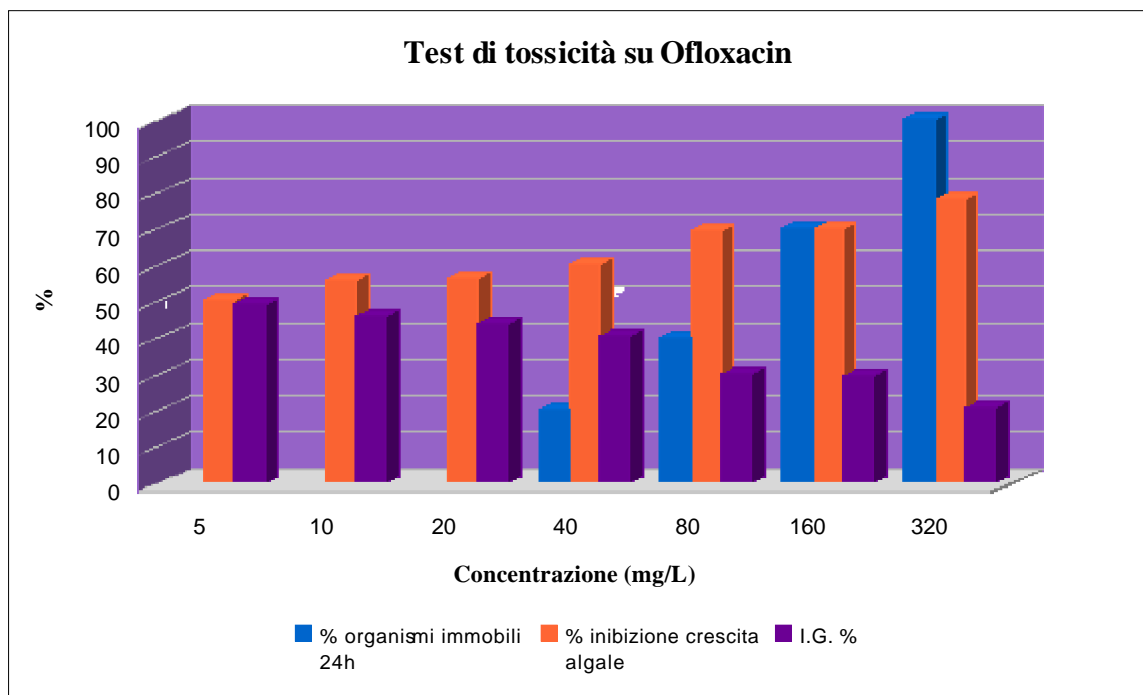


Grafico 7.13: Risultati dei test di tossicità su Ofloxacin

Il grafico 7.13 mette a confronto, per lo stesso farmaco testato (a diverse concentrazioni), la risposta dei tre diversi bioindicatori, quali *D.magna*, *P.subcapiata* e *L.sativum*.

Nel grafico si osserva una particolare sensibilità da parte del bioindicatore *Pseudokirchneriella subcapiata*, il quale mostra mediamente un'inibizione della crescita algale superiore al 50%.

ERYTHROMYCIN						
Conc mg/L	% org. Imm. 24h	% inib. cresc. algale	I.G. %	Dev.standard		
5	0	41,52	57,31	0	0,62	1,32
10	0	42,59	54,56	0	2,5	0,77
20	5	42,23	54,76	0,5	0,45	1,51
40	10	45,13	54,67	0,58	0,46	0,67
80	15	54,89	39,78	0,96	0,32	1,79
160	50	60,29	39,72	1,29	0,37	0,53
320	80	79,01	20,74	0,82	0,22	1,98

Tabella 7.14: Risultati dei test di tossicità su Erythromycin

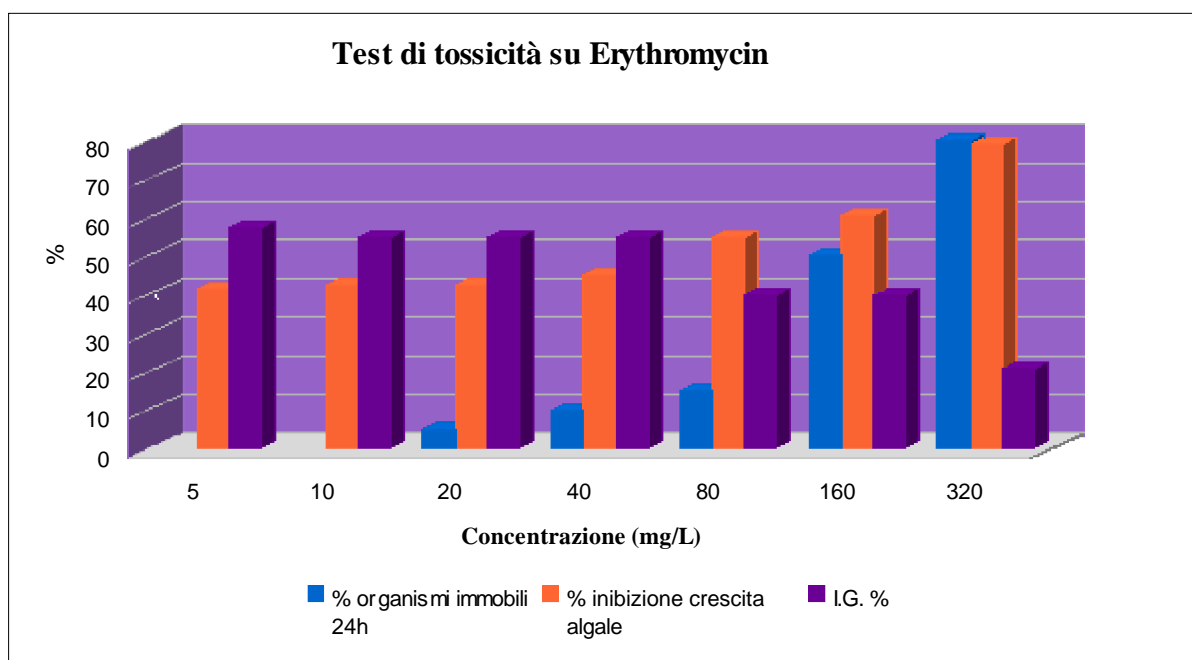


Grafico 7.14: Risultati dei test di tossicità su Erythromycin

Il grafico 7.14 mette a confronto, per lo stesso farmaco testato (a diverse concentrazioni), la risposta dei tre diversi bioindicatori, quali *D.magna*, *P.subcapitata* e *L.sativum*.

Nel grafico si osserva una maggiore sensibilità da parte del bioindicatore *P.subcapitata*, e ciò si deduce da un'inibizione della crescita algale mediamente alta fin dalle concentrazioni più basse.

SULFAMETHOXAZOLE						
Conc mg/L	% org. Imm. 24h	% inib. cresc. algale	I.G. %	Dev.standard		
5	0	69,69	64,09	0,5	0,76	1,65
10	0	74,14	56,67	0,82	1,2	1,09
20	0	75,26	56,33	0,5	0,51	0,64
40	25	76,31	61,37	0,58	0,89	0,29
80	40	78,09	47,49	0	0,76	1,03
160	75	78,81	44,89	0	0,85	0,27
320	90	82,69	35,08	0	0,51	1,02

Tabella 7.15: Risultati dei test di tossicità su Sulfamethoxazole

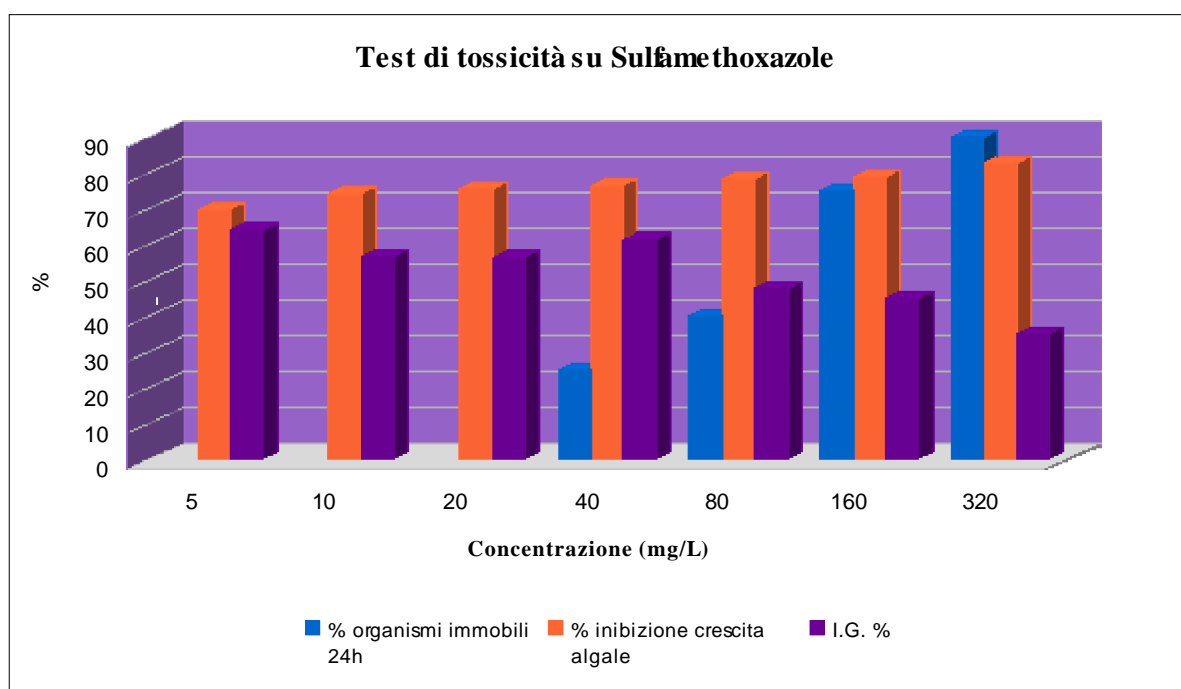


Grafico 7.15: Risultati dei test di tossicità su Sulfamethoxazole

Il grafico 7.15 mette a confronto, per lo stesso farmaco testato (a diverse concentrazioni), la risposta dei tre diversi bioindicatori, quali *D.magna*, *P.subcapitata* e *L.sativum*.

Dai risultati dei test di tossicità sul farmaco Sulfamethoxazole mostrati nel grafico si evince che l'alga *P.subcapitata* rappresenta il bioindicatore più sensibile mostrando una tossicità mediamente superiore al 75%.

ATENOLOL						
Conc mg/L	% org imm 24h	% inib cresc algale	I.G. %	Dev.standard		
5	20	28,85	70,9	0	1,37	1,08
10	25	39,23	58,78	1,26	2,08	2,37
20	30	42,92	57,89	0,58	1,73	0,21
40	35	34,89	68,08	0,5	3,41	0,19
80	40	46,42	55,21	0,82	4,06	0,66
160	55	51,17	50,07	0,5	3,97	1,07
320	65	50,93	49,43	0,5	3,23	1,07

Tabella 7.16: Risultati dei test di tossicità su Atenolol

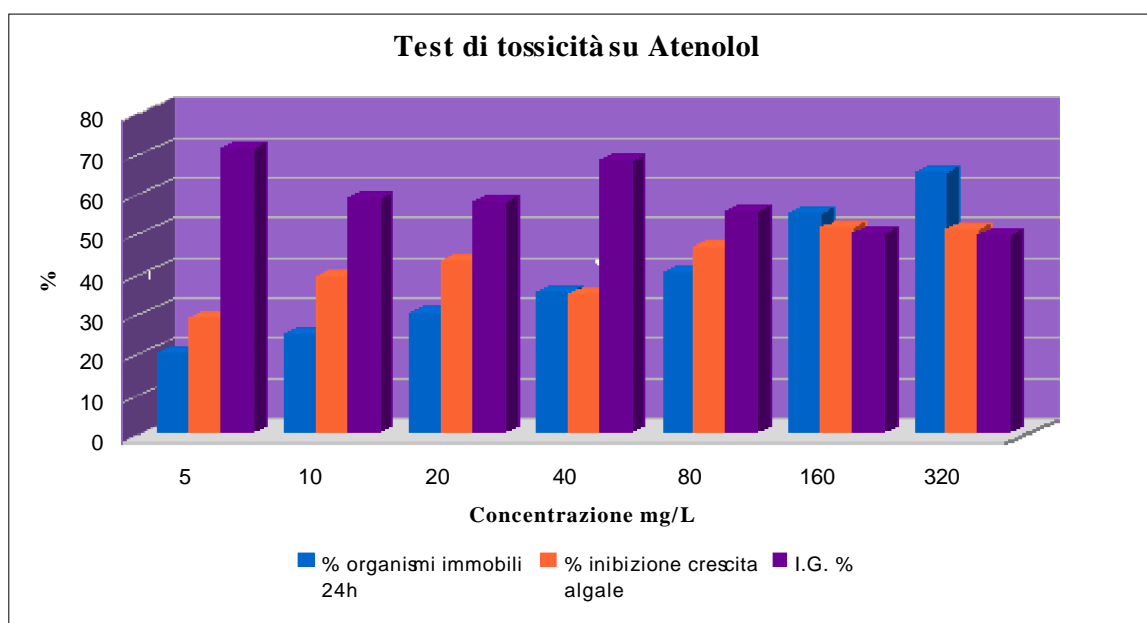


Grafico 7.16: Risultati dei test di tossicità su Atenolol

Il grafico 7.16 mette a confronto, per lo stesso farmaco testato (a diverse concentrazioni), la risposta dei tre diversi bioindicatori, quali *D.magna*, *P.subcapiata* e *L.sativum*.

Il grafico mostra una risposta molto simile da parte dei due bioindicatori *Daphnia magna* e *Pseudokirchneriella subcapitata*, infatti si riscontra un effetto tossico da parte del farmaco testato fin dalle concentrazioni più basse in entrambi i casi.

PROPANOLOLO						
Conc mg/L	% org.imm. 24h	% inib. Cresc. algale	I.G. %	Dev.standard		
5	95	31,94	69,23	0,5	3,39	1,44
10	100	37,67	61,81	0	3,39	0,55
20	100	40,85	58,9	0	3,69	0,17
40	100	49,56	50,89	0	2,57	0,22
80	100	67,97	28,97	0	2,65	0,76
160	100	82,46	17,45	0	0,93	1,36
320	100	87,85	11,62	0	1,46	1,87

Tabella 7.17: Risultati dei test di tossicità su Propranolol

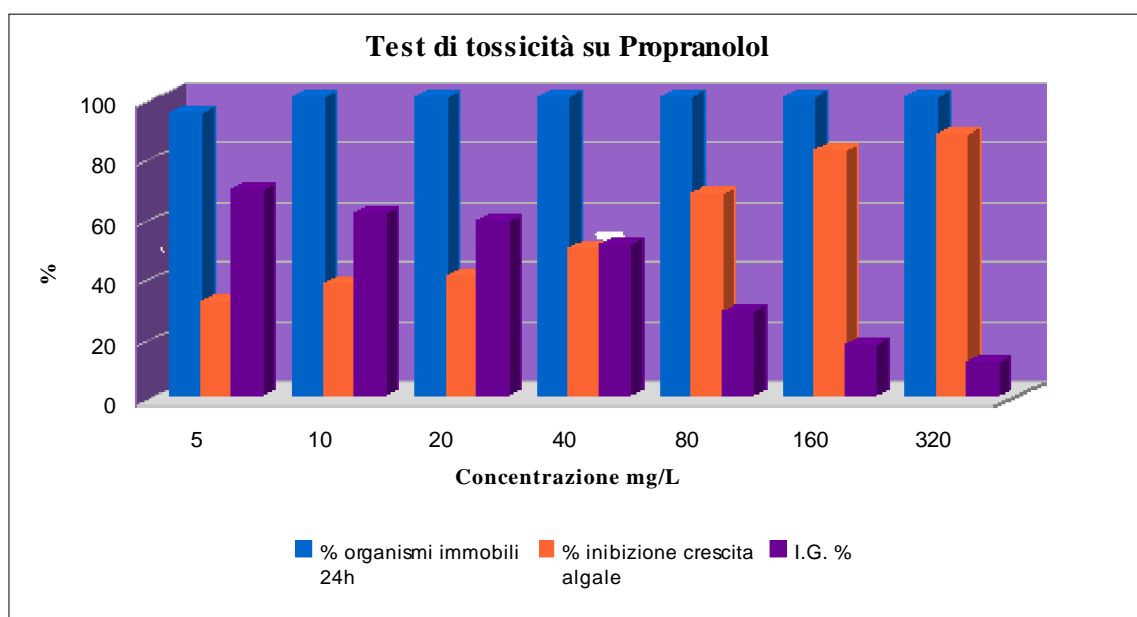


Grafico 7.17: Risultati dei test di tossicità su Propranolol

Il grafico 7.17 mette a confronto, per lo stesso farmaco testato (a diverse concentrazioni), la risposta dei tre diversi bioindicatori, quali *D.magna*, *P.subcapiata* e *L.satvum*.

Il grafico mostra una maggiore sensibilità del bioindicatore *Daphnia magna*, infatti si evince un'alta percentuale di immobilità fin dalle concentrazioni più basse.

CARBAMAZEPINE						
Conc mg/L	% org. Imm. 24h	% inib. Cresc. algale	I.G. %	Dev.standard		
5	25	56,55	74,03	0,5	4,73	0,5
10	40	54,57	70,09	0,82	4,24	0,59
20	65	61,17	66,86	0,5	1,71	0,53
40	70	67,49	53,83	0,58	1,22	0,39
80	85	73,33	46,62	0,96	3,17	1,82
160	100	76,87	45,56	0	2,01	1,9
320	100	80,99	19,04	0	0,71	0,9

Tabella 7.18: Risultati dei test di tossicità su Carbamazepine

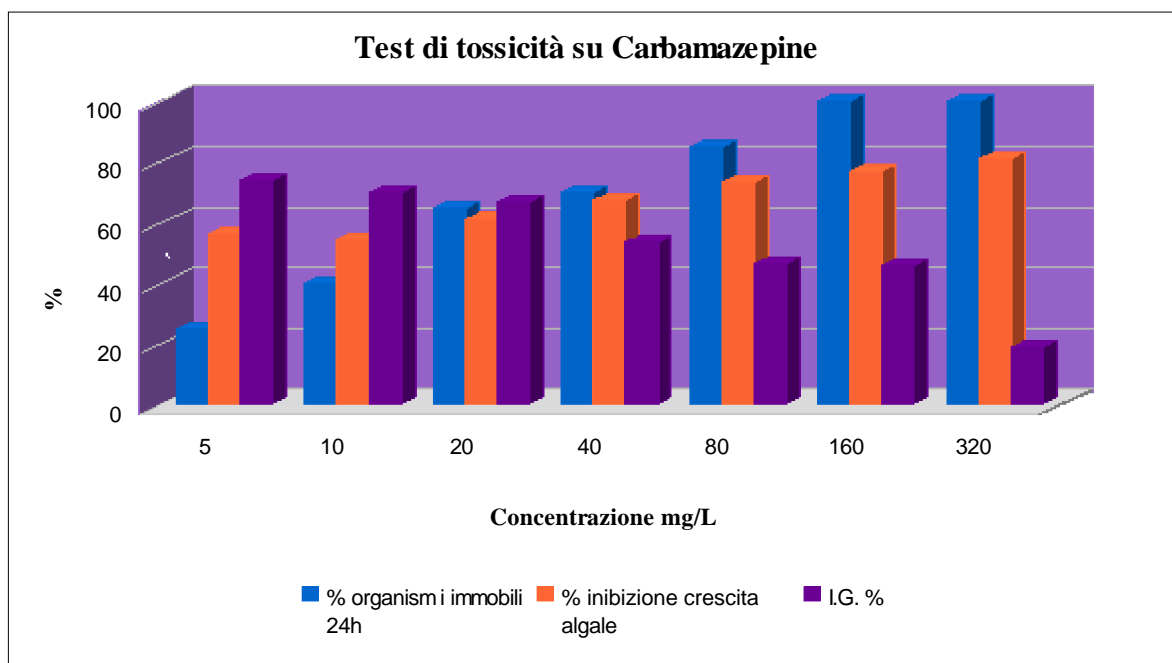


Grafico 7.18: Risultati dei test di tossicità su Carbamazepine

Il grafico 7.18 mette a confronto, per lo stesso farmaco testato (a diverse concentrazioni), la risposta dei tre diversi bioindicatori, quali *D.magna*, *P.subcapiata* e *L.sativum*.

Nel grafico si riscontra un'alta percentuale di inibizione della crescita algale sin dalle concentrazioni più basse, dimostrando, pertanto, una maggiore sensibilità da parte di

Pseudokirchneriella subcapiata rispetto agli altri bioindicatori.

7.3. RISULTATI DEI TEST DI TOSSICITA' ACUTA MEDIANTE L'UTILIZZO DI DAPHNIA MAGNA

I dati ottenuti dai saggi di tossicità acuta con D.magna a 24 ore per i nove farmaci testati sono riportati in tabella 7.19 e illustrati nel grafico 7.19.

% ORGANISMI IMMOBILI 24 h									
Concentrazione mg/L	AMOXICILLIN	OFLOXACIN	ERYTHROMYCIN	SULFAMEHOXAZOLE	IBUPROFEN	DICLOFENAC	ATENOLOL	PROPRANOLOL	CARBAMAZEPINE
5	70	0	0	35	100	0	20	95	25
10	100	0	0	40	100	0	25	100	40
20	100	0	5	75	100	0	30	100	65
40	100	20	10	90	100	0	35	100	70
80	100	40	15	100	100	30	40	100	85
160	100	70	50	100	100	100	55	100	100
320	100	100	80	100	100	100	65	100	100

Tabella 7.19: Risultati saggio di tossicità acuta con Daphnia magna a 24 ore.

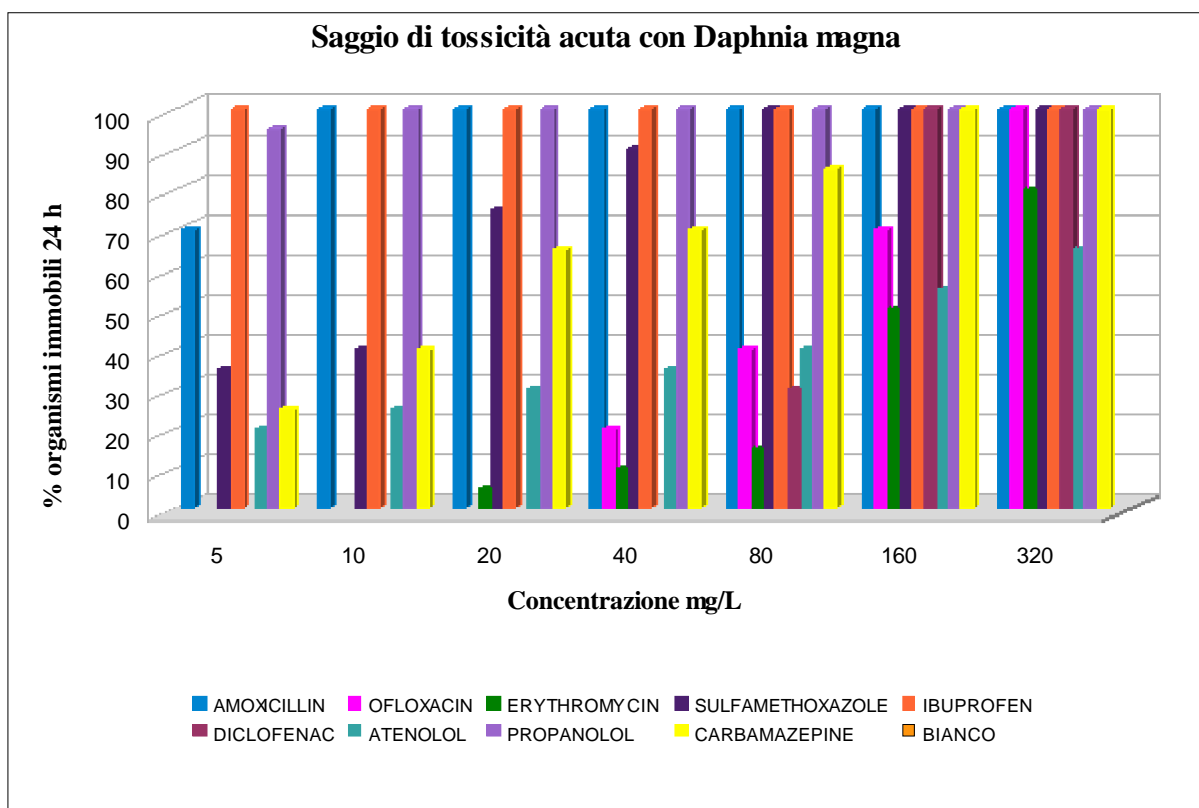


Grafico 7.19: Risultati saggio di tossicità acuta con Daphnia magna a 24 ore.

Il farmaco Ibuprofen, dopo 24 ore di esposizione, causa il 100% di organismi immobili a partire fin dalla concentrazione più bassa ed un effetto simile è stato registrato per Propranolol e Amoxicillin; pertanto questi tre farmaci risultano essere più tossici rispetto agli altri campioni.

% ORGANISMI IMMOBILI 48h									
Concentrazione mg/L	AMOXICILLIN	OFLOXACIN	ERYTHROMYCIN	SULFAMETHOXAZOLE	IBUPROFEN	DICLOFENAC	ATENOLOL	PROPRANOLOL	CARBAMAZEPINE
5	90	0	15	50	100	0	30	100	50
10	100	0	20	75	100	0	45	100	65
20	100	0	25	95	100	0	50	100	75
40	100	30	35	100	100	0	70	100	85
80	100	55	75	100	100	40	80	100	100
160	100	80	80	100	100	100	90	100	100
320	100	100	100	100	100	100	95	100	100

Tabella 7.20: Risultati saggio di tossicità acuta con Daphnia magna a 48 ore

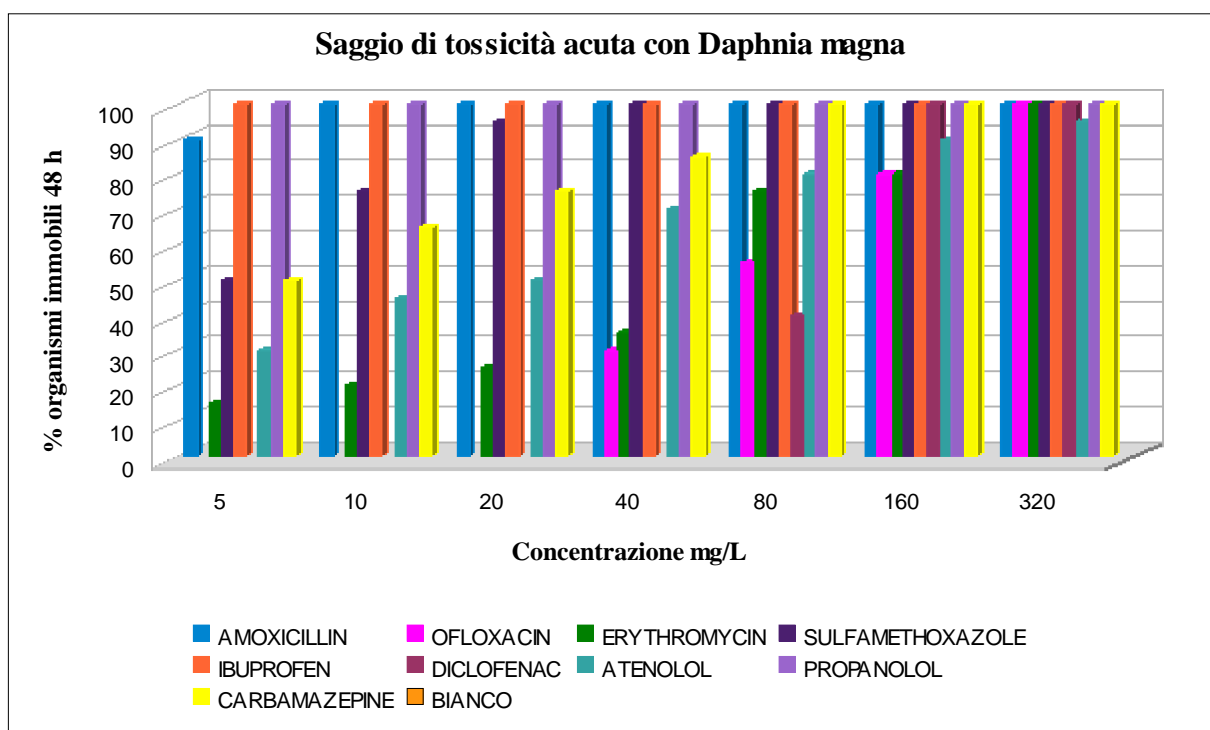


Grafico 7.20: Risultati saggio di tossicità acuta con Daphnia magna a 48 ore

L'osservazione dei test si è protratta per ulteriori 24 ore e dai risultati ottenuti (tabella 7.20, grafico 7.20) si è riscontrato che tutti i farmaci testati hanno causato un effetto tossico maggiore al crescere delle concentrazioni considerate ed il 100% di immobilità alla

concentrazione finale di 320mg/L, eccetto che per Atenolol che ha registrato il 95% di organismi immobili.

7.4. RISULTATI DEI TEST DI FITOTOSSICITA' MEDIANTE L'UTILIZZO DI LEPIDIUM SATIVUM

I nove farmaci sono stati sottoposti a test di fitotossicità i cui end-points sono stati la germinazione e la lunghezza radicale.

Dai risultati (tabella 7.21, grafico 7.21) si evince una registrazione della stimolazione della germinazione e della crescita radicale per tutti e nove i farmaci. Ibuprofen rappresenta però il campione che ha permesso una crescita minore (I.G.% 4,58) rispetto agli altri.

INDICE DI GERMINAZIONE									
Concentrazione mg/L	AMOXICILLIN	OFLOXACIN	ERYTHROMYCIN	SULFAMETHOXAZOLE	IBUPROFEN	DICLOFENAC	ATENOLOL	PROPRANOLOL	CARBAMAZEPINE
5	62,81	49,12	57,31	64,09	86,72	78,16	70,89	69,23	74,03
10	53,02	45,89	54,56	56,67	78,93	69,31	58,78	61,81	70,09
20	45,68	43,97	54,76	56,33	76,58	62,37	57,89	58,89	66,86
40	34,26	40,72	54,67	61,37	32,59	47,89	68,08	50,89	53,83
80	25,29	30,26	39,78	47,49	31,18	28,71	55,21	28,97	46,62
160	19,58	29,67	39,72	44,89	16,22	12,85	50,07	17,45	45,56
320	12,24	20,96	20,74	35,08	4,58	10,92	49,43	11,62	19,03

Tabella 7.21: Risultati saggio di fitotossicità acuta con *Lepidium sativum*.

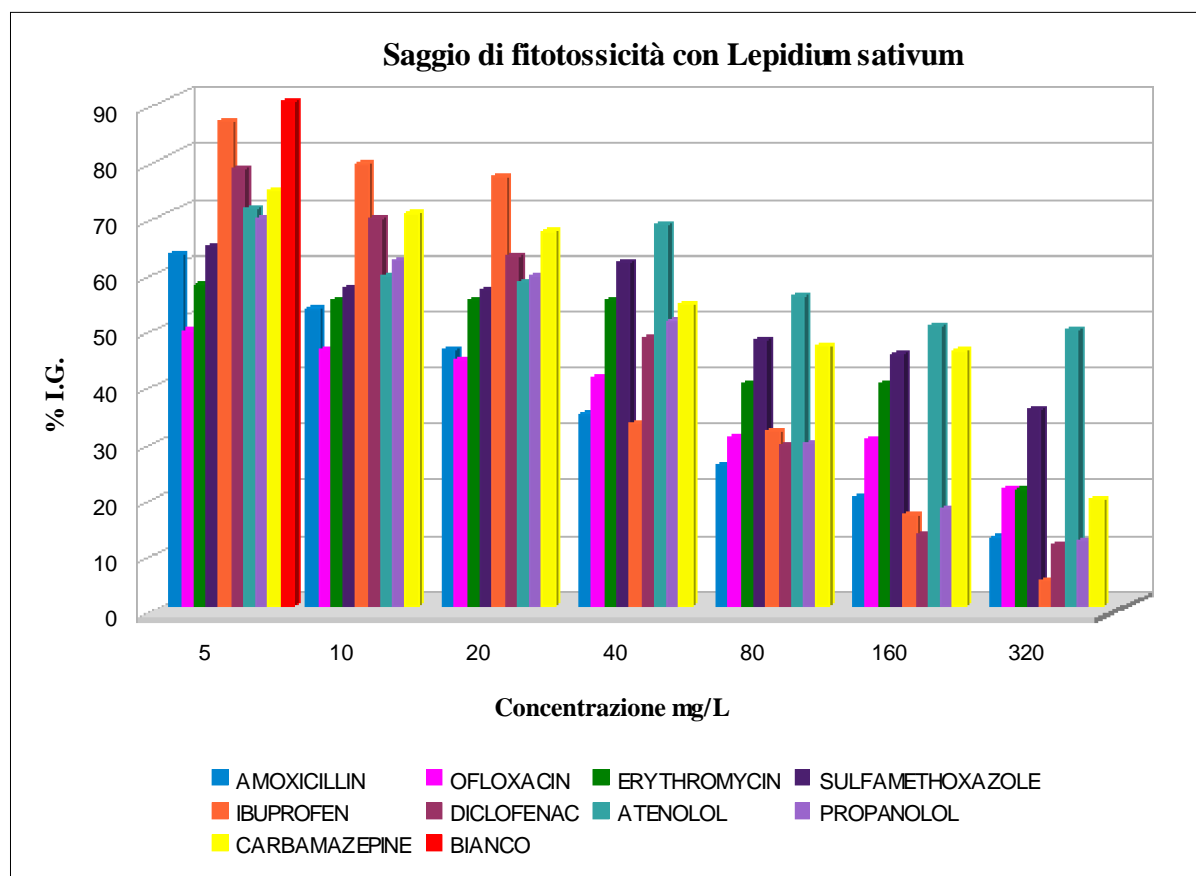


Grafico 7.21: Risultati saggio di fitotossicità acuta con *Lepidium sativum*.

7.5. RISULTATI DEI TEST DI TOSSICITA' CRONICA MEDIANTE L'UTILIZZO DI P.SUBCAPITATA

Sono stati eseguiti test di inibizione della crescita algale mediante *Pseudokirchneriella subcapitata* su ciascuna concentrazione individuata per i nove farmaci.

Dai risultati ottenuti (tabella 7.22, grafico 7.22) si è riscontrato un elevato livello di inibizione della crescita algale anche a concentrazioni basse ed in particolar modo nel caso del farmaco Amoxicillin, che risulta il campione con un maggiore effetto tossico a carico dell'alga.

% INIBIZIONE CRESCITA ALGALE									
Concentrazione mg/L	AMOXICILLIN	OFLOXACIN	ERYTHROMYCIN	SULFAMETHOXAZOLE	IBUPROFEN	DICLOFENAC	ATENOLOL	PROPRANOLOL	CARBAMAZEPINE
5	89,75	50,52	41,52	69,69	44,32	21,29	28,85	31,94	56,55
10	90,82	55,78	42,59	74,14	53,47	29,33	39,23	37,67	54,57
20	94,91	56,15	42,23	75,26	64,02	38,57	42,92	40,85	61,17
40	97,56	60,03	45,13	76,31	75,94	52,12	34,89	49,56	67,49
80	97,24	69,39	54,89	78,09	79,85	71,64	46,43	67,97	73,33
160	97,99	70,21	60,29	78,81	89,91	87,16	51,17	82,46	76,87
320	98,72	78,37	79,01	82,69	95,68	88,39	50,93	87,85	80,99

Tabella 7.22: Risultati saggio di tossicità cronica con *Pseudokirchneriella subcapitata*.

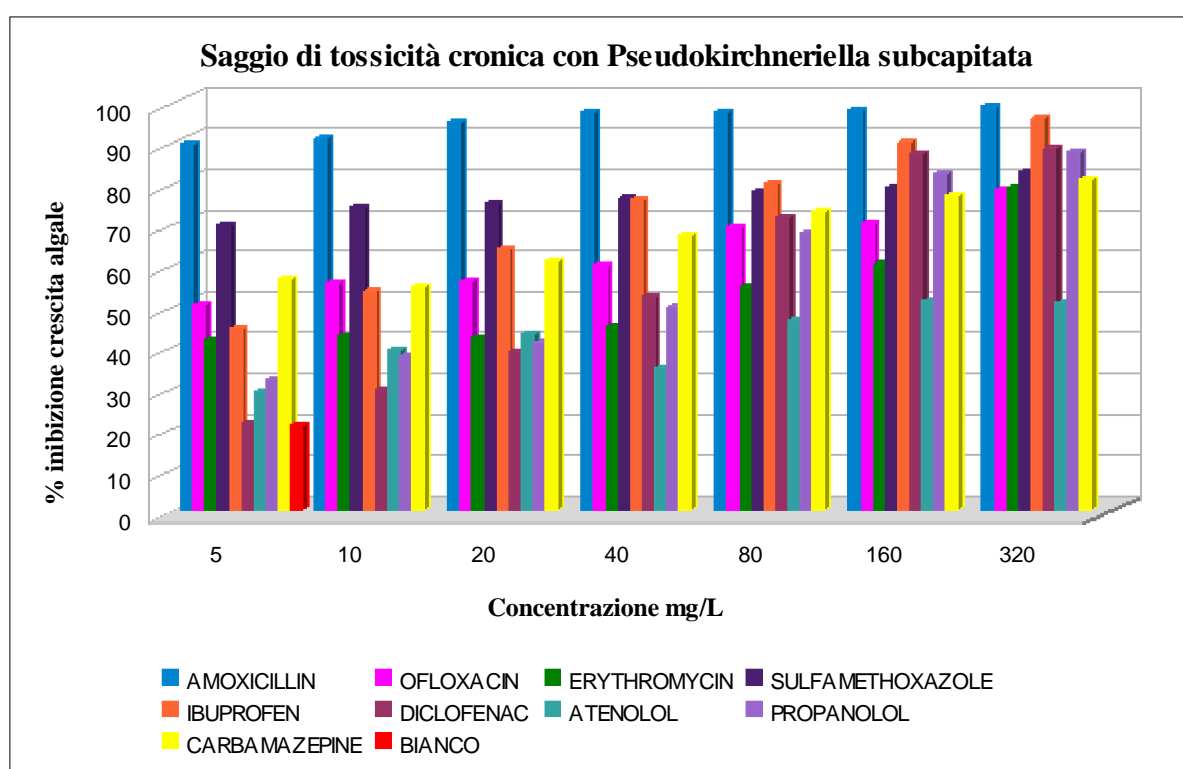


Grafico 7.22: Risultati saggio di tossicità cronica con *Pseudokirchneriella subcapitata*.

7.6 VALORI DI EC_{50}

La EC_{50} (concentrazione effettiva mediana) è intesa come la concentrazione in grado di produrre, per un determinato tempo di trattamento, un' incidenza pari al 50% dell'effetto scelto come misura della tossicità.

Di seguito sono riportati i valori di EC_{50} (tabella 7.23) di ciascun farmaco per ogni bioindicatore.

EC ₅₀				
FARMACO	D. MAGNA (24h)	D.MAGNA (48h)	P.SUBCAPITATA (96h)	L.SATIVUM (72h)
DICLOFENAC	95,61	87,11	53,53	174,11
IBUPROFEN	0,56	0,37	80,01	87,58
AMOXICILLIN	3,16	2,66	20,01	115,14
OFLOXACIN	91,78	67,32	212,62	NON CALCOLABILE
ERYTHROMYCIN	159,15	57,46	94,26	262,79
SULFAMETHOXAZOLE	8,32	4,41	21,71	NON CALCOLABILE
ATENOLOL	116,03	13,64	318,77	NON CALCOLABILE
PROPRANOLOL	1,63	0,97	159,99	NON CALCOLABILE
CARBAMAZEPINE	11,68	5,48	123,46	NON CALCOLABILE

Tabella 7.23: valori di EC50

8. CONCLUSIONI

Al termine del mio lavoro di tesi posso concludere che dei nove farmaci testati quelli che hanno esercitato un effetto tossico maggiore sono stati Ibuprofen, Propranolol e Amoxicillin per tutti e tre i bioindicatori utilizzati.

Questi prodotti farmaceutici, come fra l'altro dimostrato da recenti studi, sono alcuni dei farmaci ritrovati in numerose acque superficiali in Italia a livelli di rischio non trascurabile per gli organismi acquatici (Tixier C., 2003). Propranolol, uno dei tre prodotti che ho valutato maggiormente tossico, rappresenta il composto maggiormente studiato tra i farmaci beta-bloccanti, ed anche quello che esercita un effetto tossico acuto superiore rispetto agli altri beta-bloccanti indagati, e questo può essere spiegato dal semplice fatto che Propranolol è un forte stabilizzatore di membrana, mentre gli altri farmaci testati ed appartenenti alla stessa categoria non lo sono (Doggrell S.A., 1990; Huggett D.B., 2002).

Nello specifico, i risultati a cui sono giunta mediante l'utilizzo dei tre bioindicatori *Daphnia magna*, *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Lepidium sativum*, hanno evidenziato quanto segue:

- I Il test di immobilità con *Daphnia magna* condotto a 24 e a 48 h, ha registrato un'elevata percentuale di immobilità fin dalle concentrazioni più basse per la maggior parte dei farmaci presi in esame: già a 24 ore il livello di tossicità era notevole, ma a 48 ore dall'inizio del test, tutti i farmaci hanno esercitato un effetto tossico causando il 95-100% di immobilità ad una concentrazione pari a 320mg/L. Il

test con *Daphnia magna* si è rivelato affidabile e ripetitivo.

- I *Pseudokirchneriella subcapitata* rappresenta il bioindicatore più sensibile mostrando mediamente una percentuale di inibizione della crescita algale piuttosto elevata per tutti i farmaci fin dalle concentrazioni più basse, infatti, ad esempio, a partire dalla concentrazione più bassa pari a 5mg/L si è registrato un effetto tossico già superiore al 40% per la maggior parte dei campioni testati.
- I *Lepidium sativum* ha mostrato per tutti e nove i prodotti farmaceutici testati una stimolazione della germinazione e della crescita radicale mediamente del 50%, pertanto è risultato il bioindicatore che ha dato minore evidenza agli effetti tossici dei farmaci analizzati.

Il lavoro presentato si inserisce in un progetto più ampio ed articolato denominato "PHAREM-Development and application of innovative advance oxidation processes for the removal of active organic compounds in urban wastewaters and monitoring of toxicity", e i miei risultati rappresentano il punto di partenza per proseguire in uno studio ecotossicologico di miscele costituite da varie composizioni dei nove farmaci da me testati singolarmente, al fine di valutarne gli eventuali effetti sinergici o additivi sui bioindicatori.

BIBLIOGRAFIA

APAT, 2006 - L'ecotossicologia negli ambienti acquatici.

APHA, AWWA, WEF, 1995 - Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington DC n. 8:43-46.

APHA, AWWA, WEF, 1998 - Toxicity test procedure for *Daphnia magna* in: Standard methods for the examination of water. XX Editino, 8-82, 8-86 (APHA, Washington).

Backhaus T., Grimme L.H., 1999 - The toxicity of antibiotic agents to the luminescent bacterium *Vibrio fischeri*. Chemosphere. 1999; 38: 3291-301.

Baldssarre L., Tommasi M., 2003 - Test ecotossicologici su reflui di depurazione. Biologi Italiani, 9:42-47.

Baudo R., Mountau H., 1985 - Riflessioni sulle "aree problematiche" in ecotossicologia. Acqua-Aria 4:331-339.

Blutler G.C., 1978 - Principles of Toxicology. SCOPE 12. John Wiley and Sons. Chichester.

Bottoni P., Fidente R., 2005 - Un primo contributo alla problematica dei farmaci come contaminanti delle acque. 41(3):333-342.

Brogden R.N., Heel R.C., Pakes G.E., Speight T.M., Avery G.S., 1980 - Diclofenac sodium: a review of its pharmacological properties and therapeutic use in rheumatic diseases and pain of varying origin.20 (1): 24-48.

Carpenter K. E., 1924 - A study of the fauna of rivers polluted by lead minimo in the Aberystwth distrect of Cardiganshire. Annales of Applied of Biology, 11: 1.

Castiglioni S., Bagnati R., Fanelli R., Pomati F., Calamari D., Zuccato E., 2006 - Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy. *Environ Sci Technol.* 40: 357-63.

Cecchetti M., 2000 - Principi costituzionali per la tutela dell'ambiente, in collaborazione con il Dipartimento di Diritto Pubblico dell'Università degli Studi di Firenze.

Cheung Y.H., Wong M.H., Tam N.F.Y., 1989 - Root and shoot elongation as an assessment of heavy metal toxicity and 'Zn Equivalent Value' of edible crops. *Hydrobiologia*, 188/189:377-383.

Cleuvers M., 2003 - Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol. Lett.* 142 (3), 185–194.

Cleuvers M., 2004 - Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 59 (3), 309–315.

Crane M., Watts C., Boucard T., 2006 - Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals.

Daughton C.G., 2003 - Cradle-to-cradle stewardship of drugs for minimizing their environmental disposition while promoting human health. Rationale for and avenues toward a green pharmacy. *Environ Health Perspect* 2003; 11: 757-74.

D.Lgs. 10 Maggio 1976 n. 319 - Norme per la tutela delle acque dall'inquinamento coordinate con le modifiche ed integrazioni apportate dalla Legge 8/10/1976 n. 690, dalla Legge 24/12/1979, n. 650, dalla Legge 23/4/1981, n. 153. G.U. n. 48 del 21 /2/1977

D. Lgs. 5 Gennaio 1994 n. 36 – Disposizione in materia di risorse idriche. S.O. n. 11
G.U.R.I. 19 gennaio 1994, n. 14

D.Lgs. 11 Maggio 1999, n. 152 – Disposizioni sulla tutela delle acque dall'inquinamento e recepimento della direttiva 91/271/CEE concernente il trattamento delle acque reflue urbane e della direttiva 91/976/CEE relativa alla protezione delle acque dall'inquinamento provocato dai nitrati provenienti da fonti agricole.

D.Lgs. 18 Agosto 2000, n. 258 (correzioni ed integrazioni del D. Lgs. 152/99 G.U. suppl. ord. N. 218 del 18 settembre 2000

Decreto Legislativo 5 febbraio 1997 n°22 , recante “ Attuazione delle direttive: 91/156/CEE sui rifiuti, 91/689/CEE sui rifiuti pericolosi e 94/62 CEE sugli imballaggi e sui rifiuti da imballaggio”.

Decreto 26 Giugno 2000 n°219: “Regolamento recante la disciplina per gestione dei rifiuti sanitari”.

Dell'Orto N., Ciccietelli M., Cantelli D., Camatini M., 1997 - Sviluppo di un sistema di biomonitoraggio a tre componenti per la valutazione della qualità delle acque. *Acqua-Aria* 5:103-107.

Direttiva 91/676/CEE. Pubblicato sul Supplemento Ordinario n. 101 /L alla G.U. n. 124 del 29 Maggio 1999. Aggiornato con le modifiche del D.Lgs. 18 Agosto 2000 n. 258, della legge 23 Dicembre 2000 n. 388 e della legge 28 Dicembre 2002 n. 448.

Direttiva 2000/60/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 23 ottobre 2000, che istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque
GU L 327 del 22.12.2000

DI.VA.P.R.A. e I.P.L.A., 1992 - Metodi di analisi dei compost. Determinazioni chimiche, fisiche, biologiche, microbiologiche e analisi merceologica dei rifiuti. Edito da: Regione Piemonte-Assessorato dell'Ambiente.

Doggrell S.A., 1990 - The membrane stabilizing and beta1-adrenoceptor blocking activity of (+)- and (•)-propranolol on the rat left atria. *Gen. Pharmacol. Vasc. Sci.* 21 (5), 677–680.

Doudoroff P., Anderson B.G., Burdick G.E., Galstoff P.S., Hart W.B., Patrick R., Strong E.R., Ellis M.M., 1937 - Detection and measurement of stream pollution. *Bullettin of the U.S. Bureau of industrial wastes to fish. Sewage and Industrial Wastes.* 23: 1381.

European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, EMEA CPMP. , 2001 - Discussion paper on environmental risk assessment of non-genetically modified organism (non-GMO) containing medicinal products for human use. CPMP/SWP/4447/00 draft.

European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, EMEA CHMP., 2005 - Guideline on the environmental risk assessments of medicinal products for human use. CHMP/SWP/4447/00 draft.

Fent K., Weston A.A., Caminada D., 2005 - Ecotoxicology of human pharmaceuticals.

Ferrari B., Mons R., Vollat B., Fraysse B., Paxeus N., Lo Giudice R., Pollio A., Garric J., 2004 - Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? *Environ. Toxicol. Chem.* 23 (5), 1344–1354.

Ferrigno A., 2007 - L'inquinamento nascosto. Quello da farmaci. *Biologi domani* anno 4 - numero 32. Edizione 2007

Forbes V.E., Forbes T.L., 1994 - *Ecotoxicology in theory and practice.* London: Chapman & Hall.

Forsythe W.I., Gillies D., Sills M.A. , 1984 - Propranolol (innderal) in the treatment of childhood

migrain. Vol.26, 6, pp.737-741.

Gaggi C., 1998 - Saggi ecotossicologici di laboratorio. In: Ecotossicologia – Trattato di farmacologia e terapia, Utet Edizioni.

Gans S., 2006 - Health's Disease and Condition content is reviewed.

Golet E.M., Alder A.C., Hartmann A., Ternes T.A., Giger W., 2001 - Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents in urban wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. Anal Chem 2001; 73: 3632-8.

Goodman & Gilman, 2008 - Le basi farmacologiche della Terapia- Il Manuale 11/ed.

Guida M., Inglese M, Russo F, Meric S., 2007 - A comparative ecotoxicity investigation on fungicides using marine and freshwater species. MICROPOL & ECOHAZARD 2007 5TH IWA SPECIALISED CONFERENCE ON ASSESSMENT AND CONTROL OF MICROPOLLUTANT. 17 – 20 JUNE 2007. (pp. 171-176)

Guida M., Inglese M., Mattei M.L., Marino G., Scherillo S., Russo F., Borriello I., Meric S., 2007 - Osservatorio Ecotossicologico Universitario Federiciano. Ideazione, organizzazione e costituzione. ATTI 7° WORKSHOP FITOTOX. 10 MAGGIO 2007. (pp 71-74)

Guida M., Meric S., Inglese M.L., Scherillo S., Marino G., Russo F., Borriello I., Melluso G., Liguori G., 2007 - Osservatorio Ecotossicologico Universitario Federiciano (O.E.U.F.), ideazione organizzazione, esempio di applicazione. ATTI CONFERENZA NAZIONALE DI SANITA' PUBBLICA (SITI) 14-16 OTTOBRE 2007 (p.304)

Halling Sorensen B., Nors Nielsen, S., Lanzk, P.F., Ingerslev F., Holten Luthoft H.C., Jorgensen S.E., 1998 - Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment—A review. Chemosphere 36 (2), 357–393.

Hammerschlag M.R., Qumei K.K., Roblin P.M., 1992 - In vitro activities of azithromycin, clarithromycin, L-ofloxacin, and other antibiotics against *Chlamydia pneumoniae*. 36(7): 1573-1574.

Heberer T., 2002 - Occurrence, fate, and removal of pharmaceuticals residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol Lett*; 131: 5-17.

Hoffman D.J., Rattner B.A., Burton G.A.Jr., Cairns J.Jr., 2003 - *Handbook of Ecotoxicology*. Lewis Publisher.

Huber M., Canonica S., Park G., Von Gunten U., 2002 - Oxidation of pharmaceuticals during ozonation and advanced oxidation processes. *Environ Sci Technol* 2002; 37: 1016-24.

Huggett D.B., Brooks B.W., Peterson B., Foran C.M., Schlenk D., 2002 - Toxicity of selected beta adrenergic receptor-blocking pharmaceuticals (B-blockers) on aquatic organisms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 43 (2), 229–235.

Huggett D.B., Cook J.C., Ericson J.E., Williams R.T., 2003 - Theoretical model for prioritizing potential impacts of human pharmaceuticals to fish. *Hum Ecol Risk Assess*; 9: 1789-99.

Inglese M., Russo F., Mattei M.L., Guida M., 2007 Biomonitoraggio di tre fiumi della Regione Campania – Calore, Volturno, Sarno – mediante applicazione di saggi ecotossicologici con *Daphnia magna*. *ATTI CONVEGNO PETIT – OSA* (pp.222-223)

International Standard ISO 6341:1996: Water quality- Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)- Acute toxicity test.

International Standard ISO 8020:1999: Valutazione della tossicità acuta di acque superficiali, mediante il bioindicatore *Daphnia magna* Straus- Caratteristiche biologiche e morfologiche

di *Daphnia magna*.

IRSA, 1983 – Analisi della sostanza organica in decomposizione mediante biosaggio *Lepidium sativum*. – Metodi analitici per i fanghi: parametri biochimici e biologici-Quaderno IRSA, 64:8.1-8.3.

IRSA, 1993 – Saggi di tossicità con *Daphnia magna* – Atti della giornata di studio organizzata dall'Istituto Superiore per la Ricerca sulle Acque – Quaderno: 1.1–9.11.

IRSA, 1994: 8020 – Metodi di valutazione della tossicità con *Daphnia*. In Metodi analitici per le acque, Quad. Ist. Ric. Acque, 992-1002.

IRSA, 1994: 8030 – Metodi per la valutazione della tossicità acuta con batteri bioluminescenti. In Metodi analitici per le acque, Quad. Ist. Ric. Acque, 1003-1012.

IRSA, 1994: 8030 – Metodi per la valutazione della tossicità acuta con *Artemia* sp. In Metodi analitici per le acque, Quad. Ist. Ric. Acque, 1043-1049.

IRSA, 1996: Saggio di tossicità acuta con batteri bioluminescenti. Notiziario dei metodi analitici. ISSN:0392-1425.

Jobling S., Williams R., Johnson A., et al., 2006 - Predicted exposures to steroid estrogens in U.K. Rivers correlate with widespread sexual disruption in wild fish populations. *Environ Health Perspect* 2006; 114 (Suppl. 1): 32-9.

Kummerer K., 2004 - Resistance in the environment. *J Antimicrob Chemother* 54: 311-20.

Laska E.M., Sunshine A., Marrero I., Olson N., Siegel C., McCormick N., 1986 - The correlation between blood levels of ibuprofen and clinical analgesic response. 40(1): 1-7.

- Lewis M.A., Maki A.W., 1981 - Effects of water hardness and diet on productivity of *Daphnia magna* Strass in laboratory culture . *Hydrobiologia* 85, 175-179.
- L.Rizzo, S.Meric; D.Kassinis; M.Guida; F.Russo; V.Belgiorno, 2008 - Degradation of diclofenac by TiO₂ photocatalysis: UV absorbance kinetics and process evaluation through a set of toxicity bioassays. *Water Research* (2009) – 43,4 (979 - 989).
- Marchetti R., Vigano L., 1991 - Metodi per la determinazione di effetti tossici acuti con *Daphnia magna*, Atti della giornata di studio "Presentazione del saggio di tossicità con *Daphnia*", Milano, 29 Ottobre 1991; Quad. Ist. Ric. Acque, 93.
- Marchini S., 2005 - Ecotossicologia e qualità delle acque. *Ann. Ist. Super Sanità* 41(3): 371-379.
- McCarty J.M., Richard G., Huck W., Tucker R.M., Tosiello R.L., Shan M., Heyd A., Echols R.M., 1999 - A randomized trial of short-course ciprofloxacin, ofloxacin, or trimethoprim/sulfamethoxazole for the treatment of acute urinary tract infection in women. *Ciprofloxacin Urinary Tract Infection Group*. 106(3):292-9.
- McKee J.E., Wolf H.W., 1963 - *Water Quality criteria* 2nd ed. Sacramento, CA: California State.
- Murphy J., 1970 - A general method for monoxenic cultivation of *Daphnidae*, *Biol. Bull.*, 139, 321-337.
- Nappi P., Cosiglio M., 1986 - Saggi di fitotossicità: risultati delle ricerche per l'elaborazione di una metodica. Atti del Simposio "Fanghi di depurazione in agricoltura" Torino, 19-20 Novembre 1986.
- Newman M.C., 1998 - *Fundamentals of ecotoxicology*. Chelsea (MI): Ann Arbor Press.
- Normativa 93/39/CEE del Consiglio del 14 giugno 1993, che modifica le direttive 65 /65/CEE,

75/318/CEE e 75/319/CEE relative ai medicinali.

Paganelli M., 2008 - L'uso dei farmaci in Italia. La Repubblica (27 giugno 2008).

Pasini M.A., Gazzola M., Secondi A., Villa M., 2000 - Monitoraggio di corpi idrici superficiali mediante test ecotossicologici multispecie su acque e sedimenti. Atti del convegno nazionale di Ecotossicologia. Torino, 2000. Pp 78-83.

Penny C., Adams C., 1863 - Fourth report of the royal commission on pollution in Scotland. London, 2: 377.

Pomati F., Castiglioni S., Zuccato E., Fanelli R., Rossetti C., Calamari D., 2006 - Effects of environmental contamination by therapeutic drugs on human embryonic cells. Environ Sci Technol 2006; 40: 2442-7.

Ratsch H.C., 1983 - Interlaboratory Root Elongation testing of toxic substances on selected plant species. Environmental Protection Agency, carvallis Environmental Research Laboratory , Coevallis, OR.EPA. 600/3-85-051.

Read K., Purse M., 2006 - Tegretol/Carbamazepine Side Effects. Bipolar Medications Library.

Russo F., Guida M., Inglese M., Borriello I., Pagano G., Vasquez M., Fatta D., Karadaneli M., Belgiorno V., Meric S., 2007 - Evaluation of suitable existing methods for the assessment of xenobiotics: Attempts for new development in assessment methods for of pharmaceuticals (PHAREM)

Sacher F., Lange F.T., Brauch H.J., Blankernhorn I., 2001 - Pharmaceuticals in groundwater. Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Wurttemberg, Germany. J Chromatog A;938:199-210.

Stockolm County Council, 2006 - Environmentally classified pharmaceuticals.

Substance Abuse and Mental Health Services Administrator (2006). Substance Abuse and Mental Health Services Indefinite Quantity Indefinite Delivery (20 settembre 2006).

Tixier C., Singer H.P., Oellers S., Muller S.R., 2003 - Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen and naproxen in surface waters. *Environ Sci Technol*;37(6):1061-8.

Truhaut R., 1977 - Ecotoxicology. Objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicol Environ Saf*;1:151-73.

U.S. EPA, 1996 - Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.4200. Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test. EPA 712-C-96-154. April 1996.

USEPA., 1976 - Quality criteria for waters. USEPA, Washington D.C., EPA-440/9-76-023.

USEPA., 1986 - Quality criteria for waters. USEPA, Washington D.C., EPA-440/5-86-001.

USEPA., 2001 - Clarification Regarding Toxicity Reduction and Identification Evaluations in the National Pollutant Discharge Elimination System Program.

USEPA., July 1994 - Short term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organism, 3rd Ed. EPA600/491002.

USEPA., March 1991 - Technical Support Document for Water Quality-based Toxic Control. EPA/505/2-90-001, PB91-127415.

Vollenweider R.A., Saraceni C., 1964 - Un nuovo terreno nutritizio per la coltivazione di alghe planctoniche d'acqua dolce, *Mem. Ist.Ital. Idrobiol.*, 17, 215-221.

Wang W., 1990 - Literature review on higher plants for toxicity testing. *Water, Air and soil Pollution*, 59:381-400.

Webb S.F., 2001 - A data based perspective on the environmental risk assessment of human pharmaceuticals II: aquatic risk characterisation. In: Kummerer, K. (Ed.), *Pharmaceuticals in the Environment. Sources, Fate, Effects and Risks*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 319–343

Webb S.F., 2004 - A data based perspective on the environmental risk assessment of human pharmaceuticals I: collation of available ecotoxicity data. In: Kummerer, K. (Ed.), *Pharmaceuticals in the Environment. Sources, Fate, Effects and Risks*. Second edition. Berlin, Germany: Springer; 2004 a.p. 317-43.

Weigelt C., Saare O., Schwab L., 1885 - Die schädigung von fischerei und fischzucht durch industrie und hausabwasser. *Archiv für hygiene*, 3: 39.

Zuccato E., Calamari D., Natangelo M., Fanelli R., 2000 - Presence of therapeutic drugs in the environment. *Lancet* 2000; 355: 1789-90.

Zuccato E., Castiglioni S., Fanelli R., Bagnati R., Reitano G., Calamari D., 2004 - Risk related to the discharge of pharmaceuticals in the environment: further research is needed. In: Kummerer K, ed. *Pharmaceuticals in the environment*. 2nd edition. Berlin: Springer-Verlag.

Zuccato E., Castiglioni S., Fanelli R., 2005 - Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. *J Hazard Mater*; 122: 205-9.

Zuccato E., Castiglioni S., Fanelli R., et al., 2006 - Pharmaceuticals in the environment in Italy: causes, occurrence, effects and control. A Review. *ESPR* 2006; 13: 15-21.

BIBLIOGRAFIA WEB

AGENZIA ITALIANA DEL FARMACO (<http://agenziafarmaco.it>).

APAT (<http://www.apat.gov.it/site/it-IT/>)

ARPA CAMPANIA ([http:// www.arpacampani. it](http://www.arpacampani.it))

CISBA (<http://www.cisba.it/>)

CNR(<http://www.cnr.it/sitocnr/home.html>)

IRSA ([http:// www.irsa.cnr.org](http://www.irsa.cnr.org))

ISS (<http://www.iss.it/index.html>)

LA BUSSOLA, SCHEDE PROFILO FARMACI (<http://www.informazionisuifarmaci.it>).

MEDICINANET, 1997 (<http://www.medicinanet.com>).

MEDICINANET, 2008 (<http://www.medicinanet.com>).

MINISTERO DELL' AMBIENTE ([http:// www.minambiente.it](http://www.minambiente.it))

MINISTERO DELLA SANITA' ([http:// www.istisan.it](http://www.istisan.it))

REGIONE EMILIA ROMAGNA (www.aquaer.it)

SEPA (<http://www.sepa.org.uk>)

SIMA (<http://pegaso.bio.uniroma1.it/sima/>)

SINAL (<http://www.sinal.it/ita/metodi.htm>)

XAGENA 2006 (<http://www.xagenamedicina.nett>).

